



Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Física



Instituto de Investigação em Luz e Imagem (IBILI)

VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE FLUOROMETRIA OCULAR COM CÂMARA CCD DE ALTA SENSIBILIDADE

Isa Raquel Simões Branco

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2010

Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Física

Instituto de Investigação em Luz e Imagem (IBILI)

**VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE
FLUOROMETRIA OCULAR COM CÂMARA
CCD DE ALTA SENSIBILIDADE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para completar os requerimentos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, sob a orientação do Professor Doutor José Paulo Domingues do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Isa Raquel Simões Branco

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2010

Agradecimentos

Este trabalho representa o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas. Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Começo por referir o meu orientador, Professor José Paulo Domingues, pela orientação, ensinamentos, dedicação, disponibilidade e cordialidade demonstradas ao longo da realização deste trabalho.

Ao Professor Miguel Morgado pela dedicação na coordenação da cadeira de Projecto na qual se insere este trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais e irmã, pelo apoio e por me terem possibilitado frequentar o ensino superior e terem acreditado nas minhas capacidades.

E aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efectivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha gratidão.

Resumo

A fluorometria ocular é uma técnica não-invasiva de diagnóstico que consiste na medição da fluorescência ocular exógena ou endógena. A principal aplicação desta técnica é no diagnóstico precoce da retinopatia diabética (a principal causa de cegueira do mundo industrializado) através da quantificação da permeabilidade das barreiras hemato-oculares.

Desde que surgiu no mercado o fluorómetro ocular Fluorotron™ Master tem sido usado como referência em todos os estudos de fluorometria. Porém com o aparecimento de novas técnicas de fluorometria, concretamente a análise da autofluorescência da córnea como meio de diagnóstico tornou-se claro que o FM apresentava algumas limitações. Nesse contexto foi desenvolvido o fluorómetro ocular em que se baseia este trabalho.

O fluorómetro ocular funciona acoplado a uma lâmpada de fenda oftalmológica onde são colocados filtros de emissão e excitação e uma câmara CCD termoelectricamente arrefecida.

O sistema de aquisição de dados foi desenvolvido para melhorar a sensibilidade, resolução, portabilidade e programabilidade. Isto conseguiu-se através do uso de um microcontrolador dsPIC, de um ADC de 16 bits e da câmara termoelectricamente arrefecida. Este sistema permite-nos alcançar várias zonas do globo ocular e medir a autofluorescência da córnea.

Palavras-Chave

fluorometria ocular, retinopatia diabética, fluorómetro ocular

Abstract

Ocular fluorometry is a non-invasive technique of diagnosis that measures the exogenous and endogenous ocular fluorescence. The main application of this technique is the early diagnosis of diabetic retinopathy (the main cause of blindness in the industrialized world) by the quantification of the blood-ocular barriers permeability.

The Fluorotron TM Master has been used as a reference in fluorometric studies since it arose in the market. However, with the arrival of new fluorometric techniques like the analysis of the corneal endogenous fluorescence, it became clear that the FM had some limitations. So it was developed the ocular fluorometer in which this work is based.

The ocular fluorometer has been adapted to a slit-lamp and includes holders for emission and excitation filters and a thermoelectrically cooled CCD camera.

The data acquisition system has been developed to improve sensitivity, resolution, portability and to increase programmability. We can achieve this using a dsPIC microcontroller, a 16 bit ADC and the cooled CCD camera. This hardware setup allows to address several locations in the eye and to measure the corneal autofluorescence.

Keywords

Ocular fluorometry, diabetic retinopathy, ocular fluorometer

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
1. Introdução	1
2. Fluorimetria ocular	3
2.1. Aspectos básicos da anatomia do olho	3
2.1.1. Anatomia do olho	3
2.1.1.1. Segmento anterior	3
2.1.1.2. Barreiras hemato-oculares	5
2.1.2. Fluoróforos endógenos	5
2.1.2.1. Fluoróforos da córnea	6
2.1.2.2. Fluoróforos do cristalino	6
2.2. A fluoresceína como traçador em Oftalmologia	7
2.2.1. Fluorimetria do segmento anterior	8
2.2.2. Fluorimetria do vítreo	9
2.3. Fluorimetria ocular de substâncias endógenas	10
2.4. Instrumentação	10
3. Retinopatia Diabética	12
3.1. Diagnóstico e Tratamento	14
4. Descrição do Sistema de Aquisição de Dados	15
4.1. Descrição do sistema óptico	15
4.2. Descrição do sensor – FFT-CCD	16
4.2.1. Constituição	17
4.2.1.1. Circuito de controlo/amplificação	17
4.2.1.2. Circuito de Controlo da temperatura	17
4.2.1.3. Revestimento	18
4.2.2. Modo de funcionamento	18
4.2.3. Câmara FFT-CCD	19
4.2.3.1. <i>Binning</i>	21
4.2.3.2. CCD termoelectricamente arrefecida	21

4.2.3.3.	Conversão de carga para tensão	22
4.2.3.4.	Ruído.....	23
4.2.3.5.	Outras características eléctricas e ópticas	24
4.2.4.	Vantagens do uso da câmara CCD em relação aos sensores NMOS 25	
4.3.	Descrição do sistema de aquisição de dados	26
4.3.1.	Circuito de amplificação	26
4.3.2.	Conversão A/D.....	28
4.3.3.	Microcontrolador dsPIC.....	29
4.3.4.	Ligação entre o SAD e o PC	29
4.3.5.	Alimentação	30
5.	Descrição do software	31
5.1.	Software do dsPIC	31
5.1.1.	MPLAB IDE	31
5.1.2.	Estrutura do software do microcontrolador	31
	Comandos	32
5.2.	Interface Gráfica.....	33
5.2.1.	Janela de aquisição	34
5.2.2.	Parametros e início da aquisição	36
5.2.3.	Tratamento estatístico	38
6.	Resultados.....	40
6.1.	Testes <i>in vitro</i>	40
6.1.1.	Linearidade.....	41
6.1.2.	Limite mínimo de detecção (LMD)	43
6.1.3.	Resolução Axial	44
6.2.	Testes <i>in vivo</i>	45
7.	Conclusão.....	47
	Bibliografia.....	48

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da anatomia do olho humano. A câmara anterior encontra-se destacada. Adaptado de (2).	3
Figura 2: Classificação dos fluoróforos quanto à origem.	5
Figura 3: Espectro de emissão e excitação da fluoresceína. Adaptado de (12)	8
Figura 4: Esquerda: visão normal: Direita: visão com retinopatia diabética (15)-	12
Figura 5: Representação esquemática do sistema de aquisição de dados (12).	15
Figura 6: Espectros de transmissão dos filtros utilizados no fluorómetro ocular.	16
Figura 7: Função do processador de sinal de vídeo (25).	17
Figura 8: Esquema de impulsos da câmara CCD (25).	19
Figura 9: estrutura de um pixel da câmara CCD. (28)	19
Figura 10: Representação da estrutura da câmara CCD: <i>binning</i> (28)	20
Figura 11: Corrente no escuro vs temperatura. (26)	22
Figura 12: Resposta espectral do sensor para $T=25^{\circ}\text{C}$ (26)	24
Figura 13: Elementos constituintes do SAD.	26
Figura 14: Representação esquemática do amplificador somador inversor.	27
Figura 15: Representação esquemática do seguidor de ganho.	27
Figura 16: Representação esquemática do PGA.	28
Figura 17: Janela de aquisição da interface gráfica.	34
Figura 18: Janela de revisão de dados da interface gráfica.	36
Figura 19: Janela de configuração dos parâmetros de aquisição.	37
Figura 20: Barra de progressão.	38
Figura 21: Janela de tratamento estatístico.	38
Figura 22: Resposta do sensor para medições em cuvettes com soluções de fluoresceína de baix concentração.	42
Figura 23: Recta de linearidade do sensor para baixas concentrações de fluoresceína.	43
Figura 24: Curva característica para aquisição com 0ng/ml de concentração de fluoresceína.	44
Figura 25: Medidas de resolução lateral com o alvo USAF 1931.	45
Figura 26: Resultados preliminares da medição da autofluorescência da córnea (dois varrimentos).	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fluoróforos da córnea e respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão. Adaptado de (7)	6
Tabela 2: Fluoróforos do cristalino e respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão (8).....	7
Tabela 3: Técnica de fluorometria do segmento anterior (8).	9
Tabela 4: Parâmetros característicos do Fluorotron TM Master (13).....	11
Tabela 5: Valores da autofluorescência do cristalino e da córnea para pacientes com retinopatia diabética e para controles normais (23).....	14
Tabela 6: Características da câmara Hamamatsu S5469 (26)	20
Tabela 7: Características dos sensores Hamamatsu S3921-128Q e 256Q (30).....	25
Tabela 8: principais características do dsPIC30F6012A (33).....	29
Tabela 9: Organização e descrição do conteúdo do software do microcontrolador (27).	31
Tabela 10: Descrição da função dos comandos implementados no microcontrolador (27).	33
Tabela 11: Funções da janela de aquisição.	35
Tabela 12: Valores para medição da linearidade.	42

Abreviaturas

BHA: Barreira Hemato-Aquosa
BHR: Barreira Hemato-Retiniana
BHO: Barreiras hemato-oculares
ATP: Adenosina Tri-Fosfato
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleótido de Fosfato
IBILI: Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem
AVC: Acidente Vascular Cerebral
FAD: Flavina Adenina Dinucleótido
FMN: Flavina Mononucleótido
 λ_{ex} : comprimento de onda de excitação
 λ_{em} : comprimento de onda de emissão
FM: Fluorotron Master
RD: Retinopatia Diabética
DM: Diabetes
HbA_{1c}: Hemoglobina Glicosilada
CCD: *Charged Coupled Device*
FFT: *Full Frame Transfer*
SAD: Sistema de Aquisição de Dados
ADC: Conversor analógico-digital
LED: Díodo Emissor de Luz
A/D: Analógico/Digital
MOS: *Metal Oxide Semiconductor*
HC MOS: *High-Density Complimentary Metal Oxide Semiconductor*
PRNU: *Photo Response Non-Uniformity*
MPP: *Multi Pinned Phase*
FDA: *Floating Diffusion Amplifier*
CTE: Eficiência de Transferência de Carga
RS-232: *Recommended Standard 232*
DC: *Discontinuous Current*

PGA: Amplificador de Ganho Programável

MSPS: milhões de amostras por segundo

EUA: Estados Unidos da América

CPU: *Central Processing Unit*

RAM: *Random Access Memory*

EEPROM: *Electrically-Erasable Programmable Read-Only Memory*

UART: *Universal Asynchronous Receiver/Transmitter.*

SPI: *Serial Peripheral Interface*

PC: *Personal Computer*

LMD: Limite Mínimo de Detecção

1. Introdução

A fluorometria ocular tem sido utilizada desde os anos 80 para medir não invasivamente a presença e concentração de traçadores fluorescentes e mais recentemente a autofluorescência dos fluidos e tecidos oculares. A quantidade dos fluoróforos oculares pode ser relacionada com a idade e com patologias de um indivíduo. Esta quantificação é particularmente útil no diagnóstico precoce da retinopatia diabética pois permite avaliar a permeabilidade das barreiras hemato-oculares depois de administração sistémica de fluoresceína. Mais recentemente verificou-se que a autofluorescência da córnea esta correlacionada com a permeabilidade das BHO e logo, com a retinopatia diabética.

Nesse sentido desenvolveu-se um fluorómetro ocular baseado numa lâmpada de fenda oftalmológica com câmara CCD de alta sensibilidade com capacidade para medir a fluorescência da câmara anterior. Este trabalho teve como objectivo principal a caracterização e validação da câmara CCD termoelectricamente arrefecida recentemente instalada através do estabelecimento das especificações e parâmetros *in vitro*, e numa fase final a realização de testes *in vivo*.

Este trabalho resultou na publicação de dois trabalhos:

J. P. Domingues, Manuel Vítor, Isa Branco and A. M. Morgado; *CCD based in vivo Quantitative Ocular Fluorometry*; 1st Annual Meeting of IBILI; 11-13 Dec 2009, Coimbra

J. P. Domingues, Isa Branco and A. M. Morgado; *Corneal Quantitative Fluorometry – a slit-lamp based platform*; Medicon 2010, May 27-30, Chalkidiki, Greece

Este trabalho começa com a explicação dos conceitos relacionados com a fluorometria ocular (Capítulo 2). Faz-se uma descrição da anatomia do olho, dando-se mais ênfase à câmara anterior, e dos fluoróforos endógenos presentes na córnea e no cristalino. Seguidamente passa-se pelas técnicas utilizadas em fluorometria ocular após administração de fluoresceína, pela fluorometria de substâncias endógenas e pela instrumentação utilizada.

No Capítulo 3 fala-se da retinopatia diabética e fundamentos que levaram ao uso da fluorometria ocular com método de diagnóstico desta patologia.

Nos Capítulos 4 e 5 faz-se a descrição do sistema de fluorometria ocular em que se baseia este trabalho, dando-se especial importância a descrição da estrutura, características e princípio de funcionamento da câmara CCD.

Seguidamente, no Capítulo 6 são apresentados os resultados obtidos e uma descrição detalhada dos testes realizados *in vitro* e *in vivo*. Por último apresentam-se as conclusões retiradas do trabalho, dando especial atenção ao trabalho futuro.

2. Fluorometria ocular

O fenómeno de fluorescência foi observado pela primeira vez por Stokes em 1852, mas o facto de que este fenómeno podia ser utilizado como meio de diagnóstico foi reconhecido muito mais tarde, por Stubel em 1911. Desde à muito que têm sido feitos esforços para se conhecer a origem da autofluorescência dos tecidos e muitos fluoróforos têm sido descobertos usando as mais variadas técnicas (1).

2.1. Aspectos básicos da anatomia do olho

2.1.1. Anatomia do olho

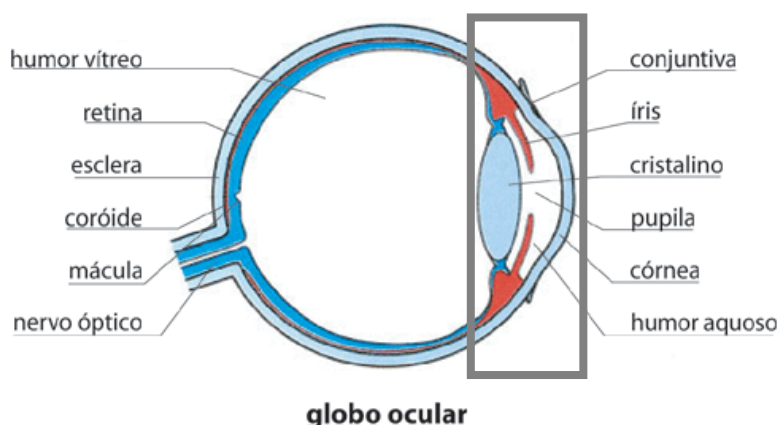


Figura 1: Representação esquemática da anatomia do olho humano. A câmara anterior encontra-se destacada. Adaptado de (2).

O globo ocular humano tem cerca de 25mm de diâmetro e é responsável pela captação de luz. Essa luz atinge em primeiro lugar a córnea, passa pelo humor aquoso e entra no globo ocular através da pupila, onde atinge imediatamente o cristalino, que funciona como uma lente de focalização convergente e colima os raios luminosos para um ponto focal sobre a retina. Na retina, as células fotossensíveis convertem a luz num impulso electroquímico que é transmitido ao cérebro através do nervo óptico (3). Na Figura 1 encontra-se representada a anatomia do olho.

2.1.1.1. Segmento anterior

O olho é constituído por dois compartimentos principais: um posterior ao cristalino e outro, muito mais pequeno, anterior ao mesmo e por quatro tecidos e fluidos transparentes: o filme lacrimal, a córnea, o humor aquoso e cristalino. O segmento anterior é composto por quatro tecidos e fluidos transparentes: o filme lacrimal, a córnea, o humor aquoso e o cristalino. O humor aquoso preenche duas cavidades: a câmara anterior fica entre a córnea e a íris, e a câmara posterior (mais pequena) fica entre a íris e o cristalino (4)(5).

Córnea

A córnea é a estrutura transparente e avascular que constitui o sexto anterior da túnica fibrosa que reveste o globo ocular e é mais curva que as outras zonas (44 Dioptrias (3)) (6). Na zona central, a córnea apresenta uma espessura de 0,52mm (6) e na periferia apresenta uma espessura maior de, aproximadamente 0,67 mm (6).

A córnea é composta por seis camadas celulares. Da zona anterior para a posterior, são elas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio. O epitélio, que é composto por 5 a 7 camadas de células, e o endotélio que é composto por uma única camada celular (6).

A energia necessária para a manutenção da desidratação e consequente transparência da córnea é obtida sob a forma de ATP através da quebra da glicose. A maior parte dessa glicose é proveniente do humor aquoso e, em caso de excesso, pode ser armazenada sob a forma de glicogénio no epitélio (6).

Câmara anterior e câmara posterior

Estas estruturas estão preenchidas por um líquido transparente e gelatinoso formado a partir do plasma sanguíneo: o humor aquoso. Este líquido ajuda a manter a pressão intra-ocular e é determinante na manutenção da forma do olho, além de ter um papel na refacção da luz e de fornecer nutrição à córnea e ao cristalino (4).

Cristalino

O cristalino é uma estrutura transparente e biconvexa coberta por uma membrana elástica. Este contribui com cerca de 20 dioptrias para a potência do sistema óptico do olho humano, sendo que esta é ajustável através da mudança de curvatura do cristalino, permitindo assim a focagem de luz proveniente de objectos a distâncias diferentes. Desempenha ainda funções de

barreira entre a câmara anterior, preenchida pelo humor aquoso, e o segmento posterior, preenchido pelo humor vítreo (4).

O cristalino é constituído por 60% de água e 38% de proteínas, principalmente cristalinas (7).

2.1.1.2. Barreiras hemato-oculares

As fronteiras que separam os fluidos intra-oculares do sangue são duas: a barreira hemato-retiniana e a barreira hemato-aquosa. A BHR é responsável pela manutenção do microambiente da retina, isto é, regula trocas entre o sangue e o espaço extravascular da retina, que por sua vez difunde e troca substâncias com o humor vítreo. A BHA regula as trocas entre o sangue e o humor aquoso. Além disso, os fluidos rodeados por estas barreiras comunicam, uma vez que existe troca de solutos por difusão entre a câmara posterior e o vítreo (8).

As principais estruturas que compõem a BHA são o corpo ciliar e a íris. Esta barreira regula a nutrição da córnea e do cristalino, que são ambas estruturas avasculares. São encontradas alterações na BHA tanto em inflamações oculares, como em traumatismos (8).

A BHR localiza-se em duas zonas distintas: na parede dos vasos da retina e no epitélio retiniano pigmentado. Esta é caracterizada pela sua selectividade. Na BHR a passagem de substâncias é feita maioritariamente por transporte activo. A orientação do transporte é maioritariamente do humor vítreo para o sangue e inclui aminoácidos, prostaglandinas e aniões orgânicos, como a fluoresceína (8).

2.1.2. Fluoróforos endógenos

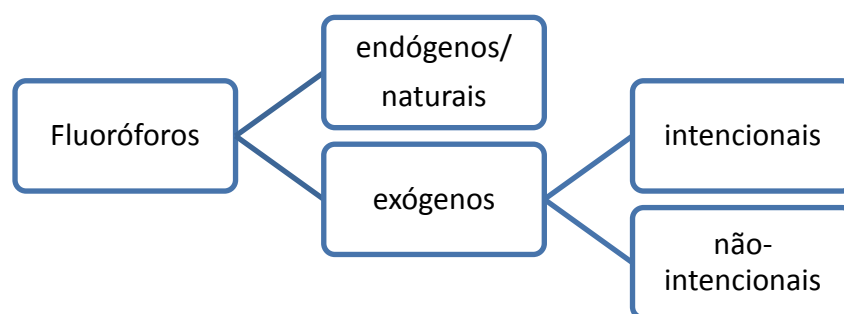


Figura 2: Classificação dos fluoróforos quanto à origem.

Os fluoróforos podem ser classificados em duas categorias (Figura 2). Os fluoróforos de ocorrência natural produzem a chamada fluorescência endógena ou autofluorescência. Os fluoróforos exógenos aparecem nos tecidos após administração tópica ou sistémica. Os últimos podem ser

classificados em não-intencionais e intencionais. Os primeiros são aqueles que são encontrados num tecido como consequência de acções de diagnóstico ou terapêutica fora desse tecido. O cristalino é um tecido conhecido por actuar como reservatório de substâncias não-intencionais. Os fluoróforos intencionais ou marcadores fluorescentes são aqueles cuja presença num determinado tecido é resultado de uma administração local com fins de diagnóstico ou terapêuticos (8).

Os tecidos oculares possuem fluoróforos de ocorrência natural. O conhecimento da ocorrência natural destes fluoróforos e das suas alterações possibilita uma monitorização e compreensão das patologias oculares.

2.1.2.1. Fluoróforos da córnea

O epitélio e o endotélio da córnea são metabolicamente activos. Isto implica a presença de mitocôndrias que contêm moléculas transportadoras de electrões nos processos de oxidação da glicose e ácidos gordos para produzir energia na forma de ATP. Estas moléculas apresentam fluorescência em certos estados. Os nucleótidos de piridina (NAD e NADP) fluorescem na sua forma reduzida e flavoproteínas (FAD e FMN) na forma oxidada. A fluorescência da córnea pode também ser originada pela glicolisação do colagénio pela reacção de Maillard. Esta reacção ocorre in vivo em situações patológicas em que ocorra um estado de hiperglicémia persistente, como no caso da diabetes (7)(9). O comprimentos de onda de excitação dos fluoróforos e emissão de fluorescência podem ser consultados na Tabela 1.

Tabela 1: Fluoróforos da córnea e respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão. Adaptado de (7)

Fluoróforo	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
NADH e NADPH	366	450
FAD e FMN	450	550
Produtos da reacção de Maillard	370 (máx.)	450 (máx.)

2.1.2.2. Fluoróforos do cristalino

O cristalino possui um grande número de fluoróforos que, quanto à origem, podem ser divididos em dois grupos: derivados ou não-derivados de triptofano. O triptofano é responsável pela fluorescência de cristalinos jovens e é relativamente constante ao longo da vida (7)(8).

À medida que vai envelhecendo vão-se formando outros pigmentos que podem ser ou não fluorescentes. Existem vários processos possíveis para a formação destes pigmentos: processos oxidativos, reticulação de proteínas pequenas e processos de glicolisação devido à glicose. A oxidação das proteínas do cristalino, devido à exposição excessiva a radiação ultra-violeta e

a luz visível, resulta na forma oxidada dessas proteínas, que sofrem reticulações entre si, causando opacidades e formação de pigmentos. Isto leva à formação de cataratas, coloração do cristalino e também à acumulação de pigmentos fluorescentes. Como tal, o envelhecimento do cristalino está associado a um aumento da sua autofluorescência (7)(10). Os fluoróforos já detectados no cristalino encontram-se na

Tabela 2.

Tabela 2: Fluoróforos do cristalino e respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão (8).

Origem	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Derivados de triptofano	290	340
	647	672
Não-derivados do triptofano	568	633
	568	591
	350	420

A acumulação anormal de fluoróforos pode ser um indicador de uma excessiva irradiação do cristalino por luz ultra-violeta, um excesso de glicose ou uma potencial formação de cataratas. Como tal, a medição nos níveis de fluorescência do cristalino por fluorometria é usada clinicamente para detectar a formação de cataratas ainda numa fase inicial e para monitorar a diabetes (7).

2.2. A fluoresceína como traçador em Oftalmologia

A fluoresceína é usada em diversas aplicações em oftalmologia, incluindo a angiografia de fluorescência e a fluorometria do vítreo.

A molécula de fluoresceína sódica tem várias características que a tornam adequada ao diagnóstico em oftalmologia. A mais importante é a sua capacidade de absorver luz de um comprimento de onda e emitir fluorescência de um comprimento de onda distinto. Os seus espectros de absorção e de emissão são estreitos: 465-490nm e 520-530nm, respectivamente (11). Além disso, este é um marcador não-tóxico, relativamente pequeno, metabolicamente inactivo e com grande poder de fluorescência (12).

Aproximadamente 80% da fluoresceína liga-se às proteínas do plasma, principalmente à albumina, não servindo para quantificar a fluorescência. Os restantes 20% permanecem livres, podendo atravessar as barreiras hemato-oculares e atingir o vítreo ou a câmara anterior. As alterações causadas nos olhos por patologias como a retinopatia diabética, provocam um aumento da permeabilidade das barreiras e consequentemente, uma maior quantidade de fluoresceína atinge o vítreo. A quantidade de fluorescência pode ser avaliada de forma qualitativa através da angiografia de fluoresceína, ou

quantitativamente através da fluorimetria do vítreo, permitindo-nos avaliar a permeabilidade das barreiras hemato-oculares (12)(11).

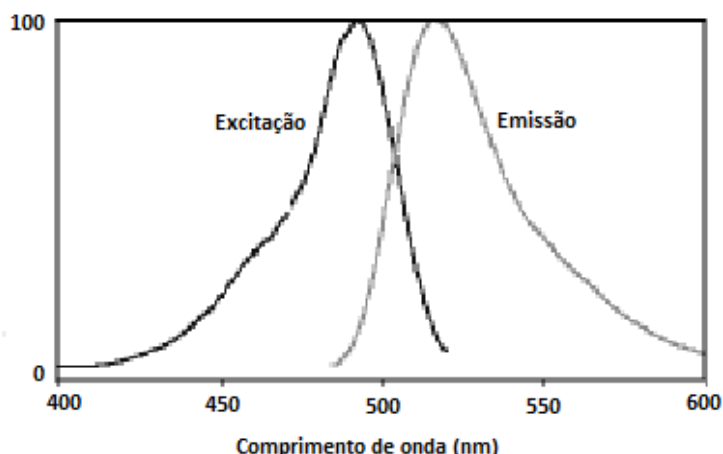


Figura 3: Espectro de emissão e excitação da fluoresceína. Adaptado de (12)

Porém, a administração intravenosa de fluoresceína pode provocar reacções adversas, que vão de brandas a severas, o que torna a medição não-invasiva dos parâmetros referidos uma mais-valia no diagnóstico em oftalmologia (11).

Existem diversos factores que afectam o espectro de emissão e o rendimento da emissão de fluorescência da fluoresceína: o facto de a fluoresceína se ligar à albumina, faz com que esta reduza a sua energia sem emitir fluorescência; em meios ácidos a emissão de fluorescência muda significativamente; quando a concentração de fluoresceína é muito elevada ocorre um fenómeno denominado extinção, resultante da absorção de luz pelo traçador; e pode ocorrer a degradação da fluoresceína devido à exposição a luz de comprimento de onda baixos (8).

2.2.1. Fluorometria do segmento anterior

Os tecidos e fluidos constituintes do segmento anterior podem ser directamente iluminados e observados. A fluorometria do segmento anterior inclui técnicas invasivas, que implicam a administração de soluções de fluoresceína e, mais recentemente, a medição não-invasiva da fluorescência endógena da córnea e do cristalino.

As técnicas que utilizam a fluoresceína como traçador incluem a determinação da *tear turnover*, determinação da permeabilidade da barreira hemato-aquosa, da permeabilidade do epitélio e do endotélio da córnea e do fluxo da câmara anterior. A medição da concentração de fluoresceína e de como esta muda com o tempo em cada compartimento da câmara anterior, permite-nos avaliar a permeabilidade das barreiras hemato-oculares e das barreiras celulares, da difusão nos tecidos sólidos e o fluxo das lágrimas e do humor aquoso (8).

Tabela 3: Técnica de fluorometria do segmento anterior (8).

Técnica	Resumo	Aplicações
Determinação da <i>tear turnover</i>	Determina-se a taxa de desaparecimento de fluoresceína depois da sua introdução gota a gota no saco conjuntival através da monitorização da fluorescência do filme lacrimal.	Os valores da <i>tear-turnover</i> encontram-se mais baixos que o normal na <i>Keratoconjunctivitis sicca</i>
Determinação da permeabilidade da BHA	Mede o aparecimento de fluoresceína na câmara anterior por difusão através da BHA, calculando a razão entre a concentração de fluoresceína na câmara anterior e no plasma.	Monitorização do tratamento de inflamação ocular; avaliar a recuperação após cirurgia às cataratas; avaliação farmacológica; espelha a permeabilidade da BHR e correlaciona-se com a progressão da retinopatia diabética.
Determinação da permeabilidade do epitélio da córnea	Calcula-se a partir da concentração de fluoresceína na córnea após se banhar o olho numa solução de fluoresceína.	Avaliação de fármacos aplicados no olho topicamente.
Determinação da permeabilidade do endotélio da córnea e do fluxo da câmara anterior	Mede-se a concentração de fluoresceína na córnea e na câmara anterior em vários períodos após a instilação de quatro gotas de fluoresceína. A permeabilidade do endotélio é calculada a partir do decaimento da fluorescência na córnea. O fluxo da câmara anterior é calculado a partir da diminuição da massa de fluoresceína na córnea e na câmara anterior.	Avaliar o efeito de fármacos para o tratamento do glaucoma.

2.2.2. Fluorometria do vítreo

A fluorometria do vítreo é a técnica mais usada em fluorometria ocular devido ao seu grande interesse clínico, dado que é a única técnica capaz de quantificar uma alteração na BHR, mesmo quando ainda não se conseguem encontrar danos visíveis a nível da retina. O objectivo desta técnica é detectar o escoamento de substâncias dos vasos para a retina, permitindo assim testar a permeabilidade e a função de transporte da BHR (8).

As características de difusão da BHR podem ser avaliadas medindo a passagem de fluoresceína do sangue para o vítreo e os espaços extracelulares

da retina, após administração sistêmica. O transporte através da barreira pode ser avaliado medindo o movimento de fluoresceína a partir do vítreo (8).

A detecção da quebra da BHR tem especial importância em oftalmologia uma vez que desempenha um papel relevante em diversas patologias da retina, como é o caso da retinopatia diabética.

2.3. Fluorometria ocular de substâncias endógenas

Esta é técnica mais recente na área da fluorometria ocular e está ainda na sua infância.

Apesar do uso de fluoresceína como traçador ser um método bem aceite e de utilidade clínica inquestionável, a fluorometria ocular de substâncias endógenas traz duas vantagens: não é necessária a administração intravenosa de uma solução de fluoresceína e não é necessário fazer a recolha de amostras de sangue (5).

Como já foi referido anteriormente alguns tecidos oculares possuem fluoróforos endógenos, sendo por isso autofluorescentes. Os valores da autofluorescência da córnea, do cristalino e da retina tem valor clínico relevante para determinadas patologias.

O valor da fluorescência endógena da córnea fornece informação acerca do seu estado metabólico e é um indicador do grau de retinopatia diabética. O valor de autofluorescência do cristalino mostra características específicas durante a formação de cataratas e na diabetes. A medição da fluorescência endógena da retina tem um papel importante em patologias como a degenerescência macular e a doença de Stargardt (5).

2.4. Instrumentação

Hoje em dia, o instrumento padrão utilizado para medições fluorométricas é o *Fluorotron™ Master* da *Ocumetrics, Inc.* Este é composto por quatro módulos: uma cabeça óptica, um computador, um monitor de display e uma impressora. Este sistema permite construir um perfil da concentração de fluoresceína ao longo do eixo óptico (da retina até à córnea) da cavidade ocular. Usando protocolos adequados as zonas de fuga da fluoresceína podem ser diferenciadas, permitindo assim monitorizar a permeabilidade da BHR e da BHA independentemente. Na Tabela 4 encontram-se algumas especificações deste instrumento (13).

Tabela 4: Parâmetros característicos do Fluorotron TM Master (13)

Resolução	0.1 ng / ml de fluoresceína (3x as flutuações do fundo)
Sensibilidade	5% com soluções < 5 ng / ml
Reprodutibilidade	3% com soluções > 5 ng / ml

O Fluorotron TM Master foi originalmente concebido para medir gradientes de fluoresceína no vítreo, porém pode ser adaptado ao segmento anterior substituindo a lente objectiva original por uma que reduza a profundidade do varrimento, permitindo assim a obtenção de um perfil de concentração de fluoresceína da córnea, da câmara anterior e do cristalino ao longo de uma linha paralela ao eixo óptico (5).

A principal desvantagem do FM e dos fluorómetros oculares existentes prende-se com o facto de estes estarem preparados opticamente para aquisições no segmento posterior do globo ocular. Além disso não é possível mudar os filtros ópticos, sendo que estes são dedicados apenas á detecção de fluoresceína, o ângulo de medição é fixo e o sistema faz um varrimento automático ao longo de todo o eixo óptico (5)(14).

O fluorómetro ocular no qual se baseia este trabalho surgiu aliado a necessidade de expandir o uso da técnica de fluorometria ocular para fora dos grandes centros de investigação e clínicas e levá-la para o consultório do oftalmologista mantendo ou melhorando as características de instrumentos já existentes (15). Para tal, caminhando no sentido de maior portabilidade, flexibilidade e baixo custo, desenvolveu-se no seio do grupo de instrumentação do IBILI e do Grupo de Electrónica e Instrumentação do Departamento de Física da Universidade de Coimbra, um fluorómetro ocular acoplado a uma lâmpada de fenda. Este instrumento foi patenteado com a seguinte designação: Pat. US 06,013,134 Jan 2000 (14).

Ao contrário dos instrumentos existentes anteriormente este fluorómetro apresenta suportes para os filtros de excitação e de emissão, que podem ser alterados e o ângulo de emissão/excitação pode ser alterado numa gama de -90 a 90°. Esta funcionalidade permite a focagem da uma zona específica do olho, por exemplo, apenas o segmento posterior, ou apenas o segmento anterior.

3. Retinopatia Diabética

Ao longo das últimas décadas a diabetes tem ganho um forte impacto económico e social. Segundo a National Diabetes Statistics 2007 (US Department of Health and Human Services) nos EUA, 23.6 milhões de pessoas, acima dos 20 anos têm diabetes, 57 milhões têm pré-diabetes e são diagnosticados todos os anos 1,6 milhões de novos casos.

A diabetes é uma doença marcada por níveis altos de açúcar no sangue resultante de deficiências na produção de insulina, na acção da insulina, ou em ambos. A diabetes pode provocar complicações graves ou morte prematura, porém podem ser tomadas medidas para detectar e controlar esta doença baixando o risco de complicações, como neuropatias, nefropatias, arteriosclerose, maior probabilidade de enfarte do miocárdio e AVC e problemas oculares (15).

Existem dois tipos de diabetes (DM). A diabetes do tipo 1 predomina em crianças e jovens adultos e deve-se à destruição das células β pancreáticas, ficando assim os indivíduos dependentes da administração regular de insulina. Na diabetes do tipo 2 ocorre uma resistência à insulina que é inicialmente combatida com um aumento da produção de insulina pelo pâncreas. A produção de insulina começa depois a diminuir provocando hiperglicémia. Este tipo da diabetes predomina em indivíduos com idade superior a 40 anos e é provocada por vários factores: genéticos, obesidade, erros alimentares ou falta de exercício (15).



Figura 4: Esquerda: visão normal: Direita: visão com retinopatia diabética (15)-

A retinopatia diabética (RD) é a complicação mais grave a nível de visão da diabetes e é a principal causa de cegueira e alterações na visão entre adultos no mundo desenvolvido. Mais de 70% dos doentes com diabetes do tipo 1 têm retinopatia diabética, dos quais 25% apresentam já RD proliferativa. Para indivíduos com diabetes do tipo 2 estes números são aproximadamente metade dos referidos para indivíduos com diabetes do tipo 1. A cegueira total ocorre em 4% dos indivíduos com DM do tipo 1 e em 1,6% dos casos de indivíduos com DM do tipo 2 (16).

Os principais factores de riscos para o desenvolvimento de RD são: a duração da diabetes e o grau de controlo glicémico. Vários ensaios clínicos provaram que o diagnóstico e tratamento precoce da RD são altamente benéficos e podem reduzir os casos de cegueira para 1% (16).

Na primeira fase da retinopatia diabética não se verificam alterações na visão. Estas complicações começam a ocorrer quando os danos atingem a mácula, zona da retina onde se formam as imagens. Podemos então dividir o desenvolvimento da RD em duas fases (15):

1. RD não-proliferativa: caracterizada pela presença de micro-aneurismas, hemorragias, alterações das características dos capilares retinianos, formação de depósitos de proteínas e lípidos e formação de edema retiniano (17).
2. RD proliferativa: caracterizada pela presença de neovascularização. Estes novos vasos podem ser facilmente deslocados levando ao deslocamento da retina, que provoca perdas de visão graves (17).

A fluorometria do vítreo abriu novas portas na compreensão da maneira como a retina é afectada pela diabetes.

A permeabilidade das BHO pode ser avaliada por fluorometria após a injeção intra-venosa de fluoresceína. Vários estudos concluíram que existe um aumento significativo da permeabilidade das barreiras em indivíduos diabéticos mesmo antes de se manifestar retinopatia (18)(19)(20). Estes resultados sugerem que existem alterações estruturais que provocam este aumento antes de se manifestar retinopatia. R. Schalhus e colaboradores (1998) obtiveram valores de permeabilidade da BHR de $(3,2 \pm 1,4) \times 10^{-7}$ cm/s para indivíduos diabéticos e de $(2,6 \pm 0,7) \times 10^{-7}$ cm/s para controlos saudáveis. Relativamente a BHA obtiveram uma permeabilidade de $(5,3 \pm 1,8) \times 10^{-4}$ /min para indivíduos diabéticos e $(3,7 \pm 0,7) \times 10^{-4}$ /min para os controlos saudáveis. Estes resultados mostram que há uma elevação da permeabilidade da BHA mais óbvia do que da BHR, tornando a fluorometria do segmento anterior uma ferramenta mais segura do que a fluorometria do vítreo (18). Os valores de fluorescência endógena da câmara anterior estão relacionados com a permeabilidade da BHA.

Verifica-se que a autofluorescência do cristalino sofre um aumento significativo antes de se manifestar retinopatia diabética. Estes valores apresentam uma correlação positiva com a idade e com a duração da diabetes. Por sua vez, os valores de autofluorescência da córnea apresentam, também, valores superiores aos normais em indivíduos diabéticos antes de se manifestar retinopatia. Porém, estes valores não se relacionam com a idade (ver Tabela 5) (21)(22)(23).

Tabela 5: Valores da autofluorescência do cristalino e da córnea para pacientes com retinopatia diabética e para controlos normais (23).

	Pacientes	Controlos
Autofluorescência do cristalino (ngEq/ml)	58,49 ± 24,59	29,11 ± 12,07
Autofluorescência da Córnea (ngEq/mlz)	6,51 ± 1,12	4,72 ± 0,89

A autofluorescência da córnea reflecte as alterações metabólicas provocadas pela diabetes, no que diz respeito aos níveis de glucose no sangue, uma vez que se relaciona com os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) e de fructosamina. Os níveis de HbA_{1c} reflectem a quantidade média de glucose no sangue nos 2-3 meses precedentes, enquanto que os níveis de fructosamina reflectem as 2-3 semanas precedentes. Verifica-se assim a utilidade da medição não-invasiva da fluorescência endógena da córnea no controlo metabólico da diabetes (23).

3.1. Diagnóstico e Tratamento

O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de tratamento da retinopatia diabética depende de uma melhor compreensão da evolução e primeiras alterações ocorridas na retina, quando estas ainda são reversíveis. A angiografia por fluoresceína caracteriza particularmente bem as mudanças iniciais que ocorrem na retina diabética (a oclusão dos capilares arteriais e a formação de micro-aneurismas nos capilares venosos) e a alteração associada da barreira hemato-ocular. Esta última alteração pode ser quantificada por fluorometria do vítreo. Sabe-se que a permeabilidade da barreira hemato-retiniana pode ser usada para avaliar o grau de danos da retina, especialmente no que diz respeito a necessidade de tratamento por fotocoagulação e aparenta ser uma ferramenta mais eficiente do que a angiografia por fluoresceína no seguimento da doença em intervalos curtos de tempo (19).

A tomografia de coerência óptica também é usada no diagnóstico da RD. Esta técnica permite obter imagens em corte da retina, que mostra a espessura da mesma, permitindo diagnosticar o edema macular (19).

A técnica mais eficaz e mais utilizada para tratar a retinopatia diabética é a fotocoagulação *laser*. Podem ser utilizadas duas aproximações neste tratamento: a fotocoagulação focal, que utiliza luz laser para selar vasos sanguíneos específicos em pequenas áreas da retina, normalmente próximo da mácula. A fotocoagulação pan-retinal é usada para atrasar o crescimento dos novos vasos sanguíneos que se desenvolveram numa área mais vasta da retina (24).

4. Descrição do Sistema de Aquisição de Dados

4.1. Descrição do sistema óptico

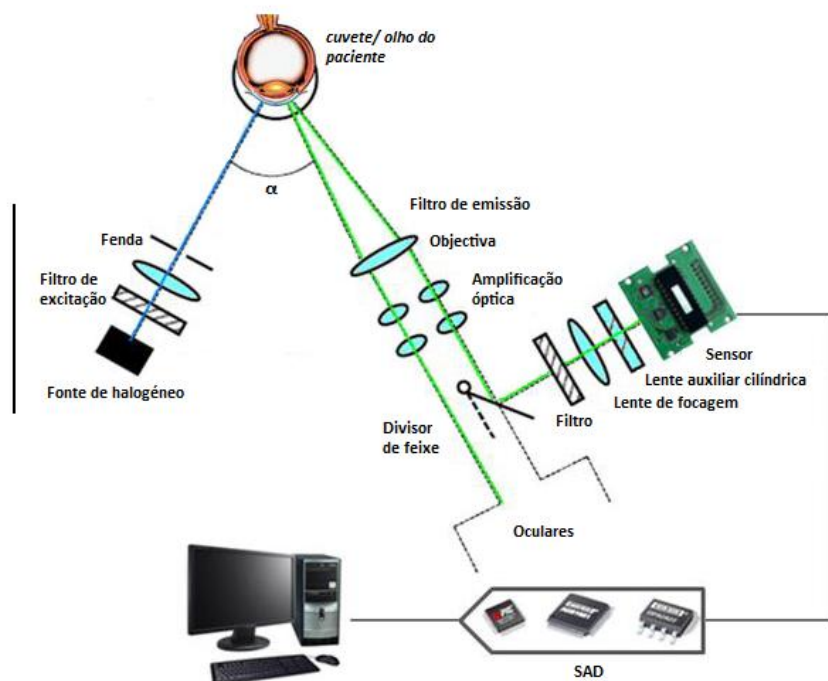


Figura 5: Representação esquemática do sistema de aquisição de dados (12).

o fluorómetro ocular no qual se baseia este trabalho foi adaptado a uma lâmpada de fenda oftalmológica (30SL-M, Zeiss).

O módulo de excitação do sistema é composto por uma fonte de luz de halogéneo e pelo filtro de excitação. O módulo de recolha de luz é baseado num biomicroscópio oftalmológico ao qual foi adicionado um divisor de feixe e outras componentes ópticas. Na Figura 5 encontra-se uma representação esquemática da óptica do fluorómetro.

Depois da luz emergir do objecto em estudo é conduzida através do filtro de emissão até à objectiva e daí para o sistema de amplificação de Galileu, onde se pode seleccionar a amplificação pretendida (5x, 8x, 12x, 20x e 30x). No divisor de feixe a luz pode seguir dois percursos distintos. Pode seguir para as oculares, onde o operador pode verificar existe a necessidade de algum ajuste ou focagem. Rodando o divisor de feixe, a luz é direccionada para o sensor de imagem, passando por uma lente auxiliar cilíndrica e por uma lente de focagem esférica de 50mm (12) que têm como função ajustar o tamanho da imagem.

A luz é focada na zona do olho que se pretende avaliar variando o ângulo da lâmpada de fenda α (Figura 5). Para aquisições da câmara anterior o ângulo deve ser de $\pm 90^\circ$.

Uma das vantagens deste fluorómetro em relação aos já existentes, é o facto de os filtros poderem ser facilmente trocados de acordo com o fluoróforo que se pretende medir.

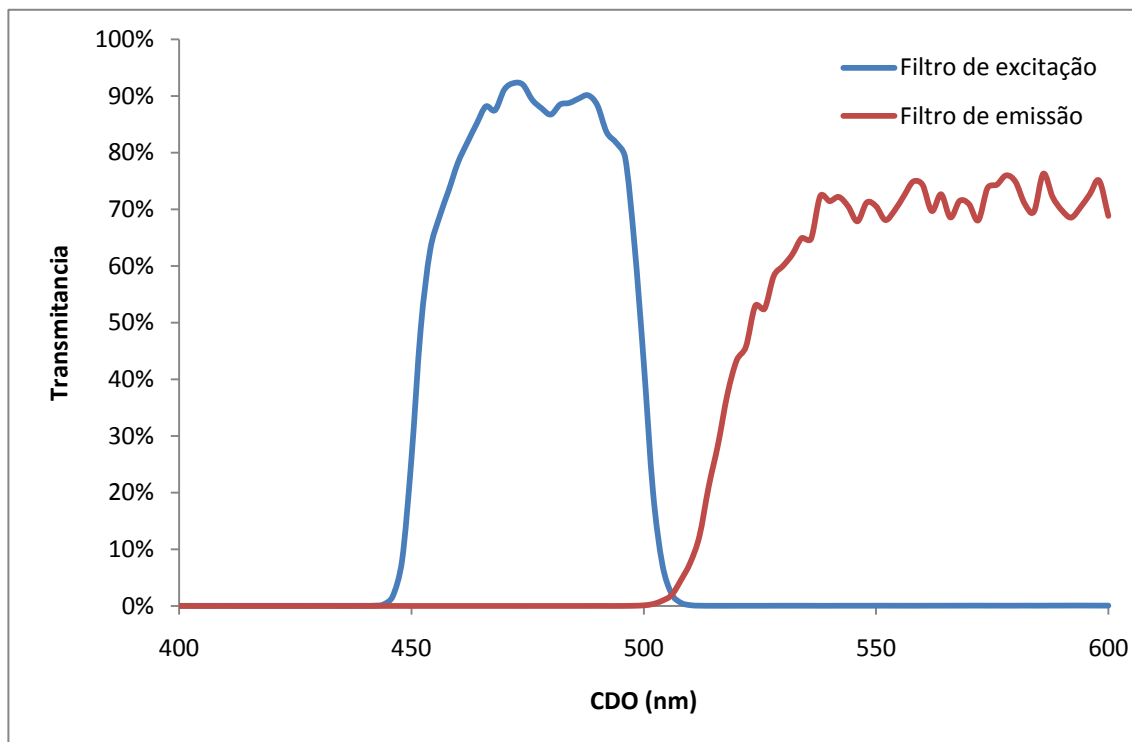


Figura 6: Espectros de transmissão dos filtros utilizados no fluorómetro ocular.

O fluorómetro conta com dois filtros cujos espectros de transmissão foram obtidos no âmbito deste trabalho e podem ser consultados na Figura 6. O filtro de excitação de banda estreita tem máximo de transmitância dos 450 aos 500nm e selecciona o comprimento de onda de excitação dos fluorómetros. O filtro de emissão tem como funções seleccionar o comprimento de onda emitido e reduzir o scattering. Estes filtros são adequados para a detecção de fluoresceína.

4.2. Descrição do sensor – FFT-CCD

O sensor actualmente utilizado no fluorómetro ocular é uma câmara CCD (Charge Coupled Device) com configuração FFT (Full Frame Transfer) da Hamamatsu, série S5469. A câmara termoelectricamente arrefecida está incorporada num módulo (*detector head*, Hamamatsu, série C5809) juntamente com um circuito de condução/amplificação de baixo ruído e um circuito de controlo de temperatura (25).

Este módulo é especialmente concebido para a detecção de níveis de luz muito baixos devido à sua alta sensibilidade e baixo ruído (25)(26).

4.2.1. Constituição

O sensor está incluído num módulo constituído pelo próprio sensor, um circuito de amplificação/condução, um circuito de controlo da temperatura e o revestimento.

Esta configuração permite operar o sensor de imagem apenas com sinais externos simples, o sensor pode ser arrefecido à temperatura programada assim que se liga o sistema e se o arrefecimento falhar, provocando um sobreaquecimento do sistema, este desliga-se automaticamente (25). Cada um destes componentes vai ser descrito a seguir:

4.2.1.1. Circuito de controlo/amplificação

O circuito de controlo/amplificação tem duas funções: fornecer os sinais de temporização necessários para operar o sensor e processar o sinal de vídeo analógico proveniente do sensor de modo a diminuir o ruído (25).

Este circuito recebe dois tipos de sinais externos, o *Start* e o CLK (fornecidos pelo dsPIC) e necessita de quatro tensões de alimentação diferentes (+5V, +15V, -15V e +24V), geradas por uma fonte de alimentação externa, incluída no sistema de aquisição de dados a descrever à frente (25).

Dentro deste circuito podemos encontrar quatro secções. O gerador de sinais de temporização fornece os sinais *Trigger* para a conversão A/D externa. Estes sinais são iniciados pelo sinal *Start* e sincronizados pelos sinais CLK (25).

O CCD *driver* faz a conversão dos sinais de temporização do nível do H-MOS para os níveis $V_L=V_{EE}$ e $V_H=V_{DD}$ (25).

O regulador de tensão do circuito gera as tensões necessárias para operar o sensor de imagem com grande precisão e estabilidade (25).

O processador do sinal de vídeo opera uma sequência de três passos com a finalidade de gerar um sinal à saída com polaridade positiva que é conduzido para o circuito de amplificação do SAD e seguidamente para o ADC externo (25).

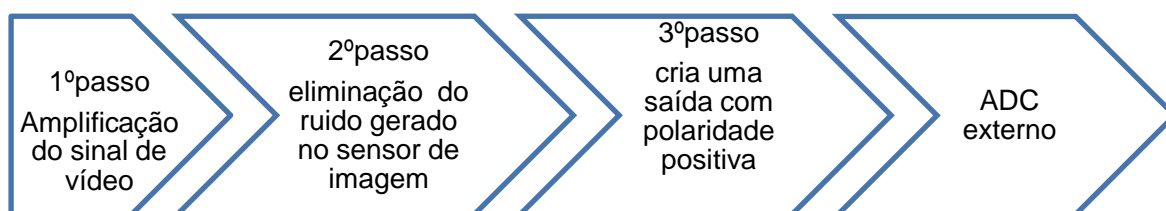


Figura 7: Função do processador de sinal de vídeo (25).

4.2.1.2. Circuito de Controlo da temperatura

O circuito de controlo da temperatura monitoriza e controla a temperatura de operação do sensor de imagem. Tem como base um termistor que opera a partir da linha do +5V e arrefece o sensor até aos 0oC. Se o sistema falhar e ocorrer sobreaquecimento, o circuito desliga-se automaticamente (25).

O módulo conta com um LED que indica o estado do sensor:

- LED OFF – o sensor está a ser arrefecido
- LED verde ON – o sensor está a 0oC
- LED vermelho ON – ocorreu sobreaquecimento do sensor.

4.2.1.3. Revestimento

A caixa de revestimento permite uma boa dissipação do calor e permite a ligação do módulo a outros componentes, neste caso, a lâmpada de fenda e a placa de hardware do SAD (25).

4.2.2. Modo de funcionamento

Assim que se liga a alimentação, deve-se ter o cuidado de verificar se o valor da corrente atinge um valor entre 1 e 1,5 A. Se tal não acontecer deve-se desligar imediatamente a alimentação ¹(25).

Os sinais de temporização que operam o sensor são cinco e todos devem estar ao nível H-CMOS (25).

O dsPIC fornece os sinais *Start* e CLK que operam o circuito de controlo/amplificação e accionam os sinais de leitura e controlo directo que se encontram implementados no próprio CCD. O sinal *Start* inicializa o circuito e a sua largura de pulso deve ser maior do que um ciclo do sinal CLK. Estes devem estar sincronizados o mais possível (25)(27).

O intervalo de pulso do sinal *Start* determina o tempo de aquisição do sensor de imagem e frequência do sinal CLK determina a frequência de leitura do sinal *Data Video*. A duração deste constitui a unidade básica de temporização e definido pelo tempo de exposição escolhido (25).

O sinal *Trigger* inicia a conversão A/D. O sinal EOS indica o fim de uma aquisição do sensor de imagem. Estes sinais constituem uma saída do CCD e são entradas directas do dsPIC e são fundamentais para a sincronização da conversão A/D com o sinal vídeo da câmara (25).

¹ A alimentação de 5V provém de uma fonte autónoma capaz de fornecer 3V.

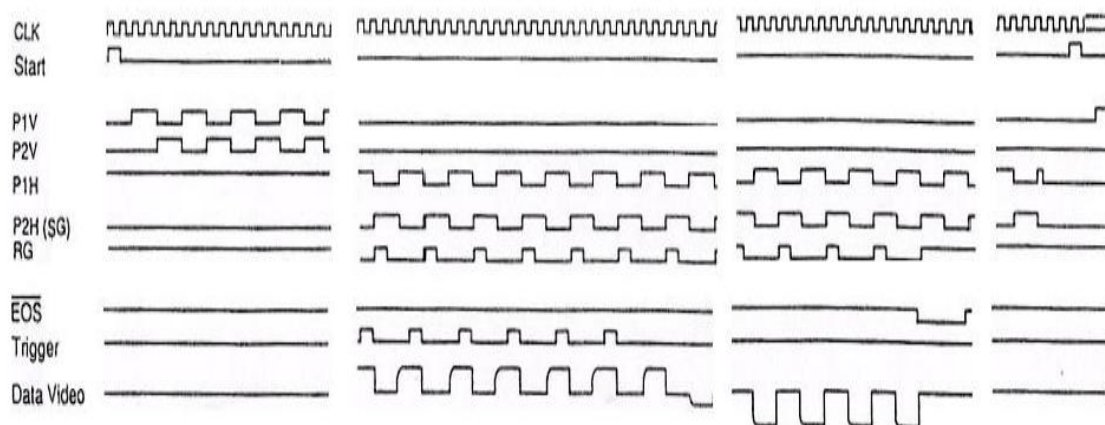


Figura 8: Esquema de impulsos da câmara CCD (25).

4.2.3. Câmara FFT-CCD

A estrutura de um CCD é baseada na arquitectura de um condensador MOS (Metal Oxide Semiconductor). Nestes dispositivos a carga é acumulada em poços de potencial que são criados quando é aplicada uma diferença de potencial nos eléctrodos P1, P2 e P3 (Figura 10). Se se aplicar uma tensão positiva em P2 relativamente a P1 e P3 consegue-se criar uma barreira de potencial onde se confinam os electrões (28).

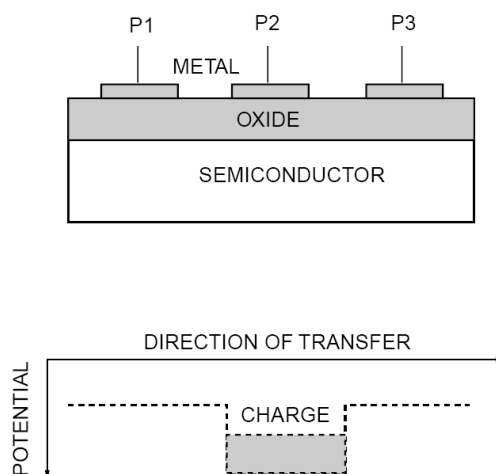


Figura 9: Estrutura de um pixel da câmara CCD. (28)

A configuração FFT é composta por dois registos de deslocamento, um vertical (região fotossensível) e outro horizontal, e por uma secção de saída (Figura 10). Quando a luz incide nos eléctrodos da região fotossensível, ocorre a conversão fotoelétrica, gerando assim carga eléctrica. Essa carga é armazenada por um certo período de tempo (tempo de integração) no poço de potencial, sendo depois transferidas verticalmente de pixel para pixel através da alteração sincronizada do potencial dos eléctrodos (28).

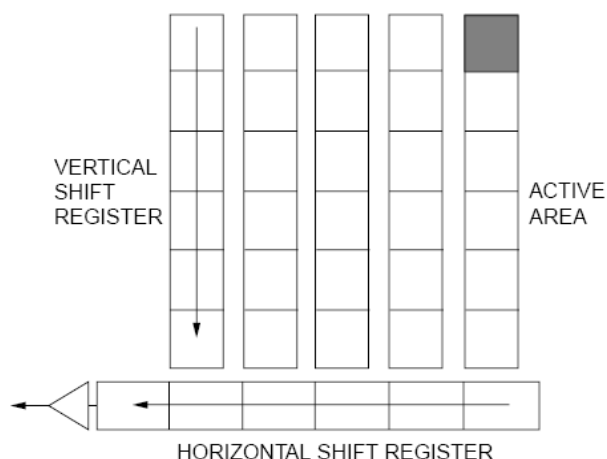


Figura 10: Representação da estrutura da câmara CCD: *binning* (28)

Com este mecanismo é possível melhorar a relação sinal ruído e a velocidade de processamento do sinal. Além disso o sensor apresenta baixo ruído e baixa corrente no escuro, possibilitando um limite mínimo de detecção baixo e tempos de integração longos, conseguindo-se assim uma gama dinâmica larga. Os principais parâmetros característicos do sensor podem ser consultados na Tabela 6 (26).

Os electrões são depois transferidos para a secção de saída através do registo de deslocamento horizontal, onde a carga é convertida para uma tensão (28).

Tabela 6: Características da câmara Hamamatsu S5469 (26)

Número de pixéis		512 (H)*64(V)
Tamanho do pixel		24μm*24μm
Área activa efectiva		12,28 mm (H)*1,24 mm (V)
Carga de saturação	Vertical	300ke-
	Horizontal	600ke-
	Soma	800ke-
Ruído de leitura		20 e ⁻ rms
Sensibilidade à saída		1,2 μ V/e-
Gama dinâmica		24k
Corrente no escuro (T=0°C)		200e ⁻ /pixel/s
PRNU (max)		±10%
Temperatura de arrefecimento		0°C

4.2.3.1. *Binning*

O *binning* é uma característica única das câmaras CCD. Existem dois processos de *binning*, *line binning* e *pixel binning*. A câmara S5469 possui ambos (26).

Durante uma aquisição a carga acumula-se bidimensionalmente nos poços de potencial durante o tempo de integração. Os registos de deslocamento vertical e horizontal recebem pulsos CLK separadamente, permitindo assim a operação de *binning* (28).

A operação de *line binning* ou *binning* vertical acumula todas as cargas presentes numa coluna do registo vertical no pixel correspondente do registo horizontal. Assim, um sensor de imagem de área (512H*64V) opera como um sensor linear, formando uma imagem linear de 512 pixéis. Aplicando um número específico de pulsos CLK no registo vertical e fazendo uma pausa na aplicação de pulsos CLK no registo horizontal, a carga acumulada em cada pixel no registo vertical vai sendo transferida até ao pixel correspondente do registo horizontal. Depois deste processo de transferência completo inicia-se a aplicação de pulsos CLK no registo horizontal e o sinal é transferido para a secção de saída (28).

O *binning* vertical traz a vantagem de se conseguir reduzir o ruído de leitura dado que se lêem os sinais verticais de uma vez.

No processo de *pixel binning* ou *binning* horizontal os sinais provenientes de duas linhas verticais são somados no registo horizontal. Esta técnica garante uma imagem com melhor contraste (28).

4.2.3.2. **CCD termoelectricamente arrefecida**

Mesmo quando não incide luz no CCD, existe a formação de uma pequena saída devido à geração térmica de electrões predominantemente na interface Si-SiO₂: a corrente no escuro.

A corrente no escuro varia com a temperatura duplicando sempre que a temperatura aumenta de 5 a 7°C (Figura 11). (26).

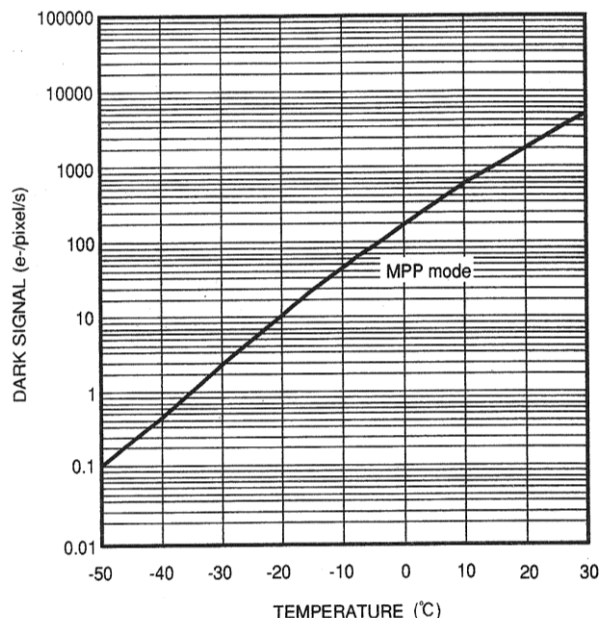


Figura 11: Corrente no escuro vs temperatura. (26)

O uso de uma câmara termoelectricamente arrefecida e a realização da operação MPP (*multi-pinned phase*) são duas maneiras de reduzir a corrente no escuro e assim melhorar o limite mínimo de detecção. As câmaras da série S5469 utilizam a operação MPP para reduzir a geração de electrões na interface referida (28).

A temperatura de arrefecimento é determinada pelos seguintes parâmetros (29):

Corrente máxima: 3,6^a

Tensão máxima: 6,2V

Absorção de calor máxima: 7,5W

Quando a potência consumida pelo refrigerador termoelétrico é baixa (<3W) o CCD é arrefecido eficientemente por um dissipador de calor e convecção natural. Se a potência consumida for superior à referida será necessário um dissipador de calor maior e convecção forçada de ar ou de um líquido (29).

4.2.3.3. Conversão de carga para tensão

A sensibilidade à saída é um parâmetro que determina o ganho da conversão de carga para voltagem do sinal à saída do sensor de imagem e está relacionada com o ruído de leitura. A conversão é realizada através do método FDA (*floating diffusion amplifier*). Neste método a carga é acumulada num nodo detector de carga, e depois convertida para uma tensão por um transistor de efeito de campo através da relação $Q=CV$. Então o sinal adquirido

sob a forma de carga (Q) aparece à saída do sensor como uma tensão de acordo com a expressão (28):

$$\Delta V_{out} = \frac{A_v \times Q}{C_{fd}}$$

Em que A_v é o ganho em tensão do transistor de efeito de campo e C_{fd} é a capacidade do nodo (29).

A sensibilidade à saída é determinada em termos do rácio entre ΔV_{out} e Q pela seguinte expressão (29):

$$S_v = 1,6 \times 10^{-19} \times \frac{\Delta V_{out}}{Q} (V/e^-)$$

4.2.3.4. Ruído

As câmaras CCD apresentam várias fontes de ruído interno (29):

- Ruído de padrão fixo: gerado devido à existência de pequenas variações da eficiência quântica entre pixéis vizinhos. Isto causa uma diferença na foto-resposta dos pixéis.
- Ruído *shot*: está associado com a variação estatística do número de fótons incidentes no sensor e segue uma distribuição estatística de Poisson. Então, o ruído *shot* calcula-se como sendo a raiz quadrada do sinal gerado.
- Ruído *shot* da corrente no escuro: como tanto a corrente no escuro como o sinal têm a mesma origem, o ruído *shot* da corrente no escuro é calculado como sendo a raiz quadrada da corrente no escuro. A única maneira de minimizar o ruído *shot* da corrente no escuro e reduzir a corrente no escuro.
- Ruído de leitura: gerado no circuito de leitura do sinal.

Tanto o ruído *shot* da corrente no escuro, como o ruído de leitura são independentes da exposição à luz (29).

A relação sinal ruído é determinada pelo ruído de padrão fixo para níveis de exposição elevados e pelo ruído *shot* para níveis de exposição baixos. O limite mínimo de detecção é determinado pelo ruído *shot* da corrente no escuro e pelo ruído de leitura. Se a corrente no escuro for suficientemente minimizada, tem-se apenas em conta o ruído de leitura.

4.2.3.5. Outras características eléctricas e ópticas

A Figura 12 mostra a resposta espectral do sensor. Estes dispositivos apresentam tipicamente uma eficiência quântica máxima de 40% para comprimentos de onda de 600 a 700 nm (28).

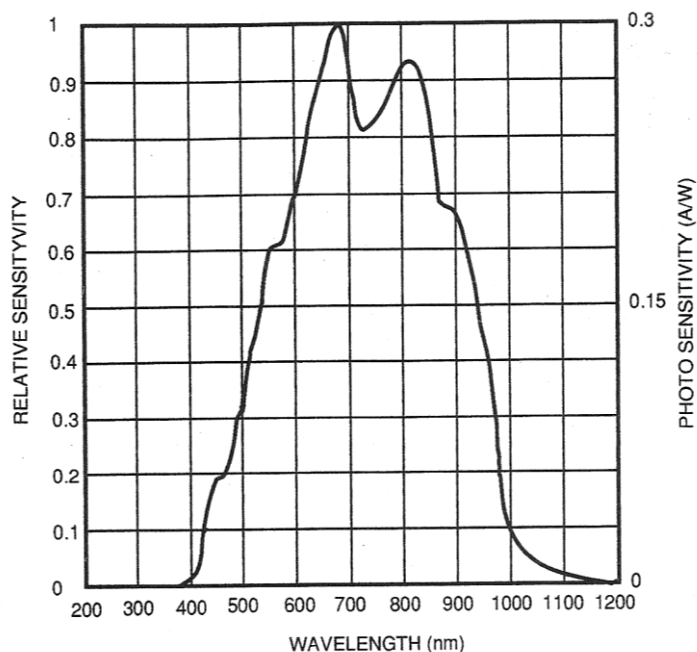


Figura 12: Resposta espectral do sensor para T=25°C (26).

A foto-resposta não-uniforme (PRNU) especifica variações de resposta de pixel para pixel, devido a uma não-uniformidade da eficiência quântica. Nas câmaras CCD a PRNU é medida escolhendo uma área da região fotossensível que esteja uniformemente iluminada (aproximadamente 50x50 pixéis). Depois representa-se graficamente o sinal (média de todos os pixéis) gerado em oposição ao ruído (desvio padrão do sinal) para vários tempos de aquisição. A foto-resposta não-uniforme é dada por (28):

$$PRNU = \frac{Ruído}{Sinal} \times 100 (\%)$$

O valor da PRNU da Tabela 6: Características da câmara Hamamatsu S5469 é medido para um sinal que é 50% da carga de saturação (26).

A carga de saturação numa câmara CCD determina a quantidade de electrões que podem ser transferidos para um poço de potencial e é determinada pela saturação do registo de deslocamento vertical. O registo de deslocamento horizontal satura a níveis mais elevados que o registo de deslocamento vertical para permitir o processo de *binning* (29).

Na operação de transferência de carga a câmara CCD usa um par de eléctrodos por pixel. A carga é transferida através da aplicação de dois pulsos

com tensões diferentes nos eléctrodos P1 e P2 (Figura 9). Ao contrário do que seria ideal, nesta operação existe sempre uma pequena quantidade de carga que se perde. Essa perda é definida pelo rácio entre a carga transferida e a carga acumulada, por pixel. Tipicamente as câmaras CCDs da Hamamatsu apresentam uma eficiência de transferência de carga (CTE) de 0,99995 (28).

A gama dinâmica refere-se à gama de valores que um dispositivo consegue medir com precisão. Para as câmaras CCD a gama dinâmica é definida como o rácio entre a carga de saturação e o ruído de leitura. É utilizado apenas o ruído de leitura, dado que como a câmara tem um sistema de arrefecimento, o ruído shot da corrente no escuro pode ser desprezado (28).

4.2.4. Vantagens do uso da câmara CCD em relação aos sensores NMOS

Os primeiros sensores testados no Fluorómetro Ocular foram os sensores de imagem linear do tipo NMOS da Hamamatsu, da série S3921 com 128 e 256 pixeis. As principais características destes sensores podem ser consultadas na Tabela 7.

Tabela 7: Características dos sensores Hamamatsu S3921-128Q e 256Q (30).

Parâmetro	S3921-128Q	S3921-256Q
Número de pixeis	128	256
Tamanho do pixel	50 μm * 2,5 mm	
Área activa	6,4*2,5 mm ²	12,8*2,5 mm ²
PRNU	± 3 %	
Gama dinâmica	47 k	
Carga no escuro	0,2-0,6 pA	
Carga de saturação	50 pC	
Resposta espectral	200-1000 nm	
Pico de sensibilidade máxima	600 nm	

Estes sensores são constituídos por um array de fotodíodos que funciona como região fotossensível, uma série de comutadores de leitura e um registo de deslocamento que faz o endereçamento dos comutadores de leitura (31).

Os sensores NMOS utilizam o método de integração de carga, ou seja, o sinal é proporcional à intensidade luminosa e a constante de proporcionalidade é o tempo de integração. Esta característica particular permite a detecção de níveis de luz relativamente baixos (31).

A principal diferença entre estes dois sensores é relativa ao método de operação. Enquanto que os sensores NMOS necessitam apenas de um nível TTL de impulso de relógio e de uma alimentação de 5V para realizar a operação de leitura, as câmaras CCD necessitam de vários pulsos de relógio e de várias alimentações (29).

Devido às diferenças de operação os sensores apresentam algumas diferenças significativas, principalmente a nível do ruído. As câmaras CCD apresentam um ruído de leitura baixo e uma velocidade de leitura elevada (<10MHz), dependendo do FDA. Os sensores NMOS apresentam ruído da ordem do milhar de electrões, porém têm a capacidade de medir sinais 100x superiores aos que os CCD conseguem suportar (29).

Portanto para intensidades mais elevadas de luz, os sensores NMOS são adequados e têm a vantagem de terem princípios de operação mais simples. Porém, para intensidades mais baixas de luz as câmaras CCD são ideais, uma vez que, como têm baixo ruído, apresentam uma relação sinal-ruído bastante para intensidades de luz que os sensores NMOS não conseguem detectar.

4.3. Descrição do sistema de aquisição de dados

O sistema de aquisição de dados usado actualmente foi desenvolvido no sentido de melhorar a sensibilidade, a resolução a portabilidade e a programabilidade do sistema. Tal alcançou-se através do uso da câmara FFT-CCD termoelectricamente arrefecida, e de um ADC de 16bits em conjunto com um microcontrolador dsPIC.

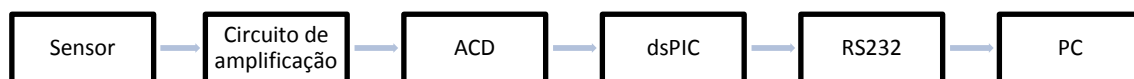


Figura 13: Elementos constituintes do SAD.

4.3.1. Circuito de amplificação

O principal objectivo do circuito de amplificação é amplificar e ajustar o sinal proveniente do sensor de imagem à entrada do ADC.

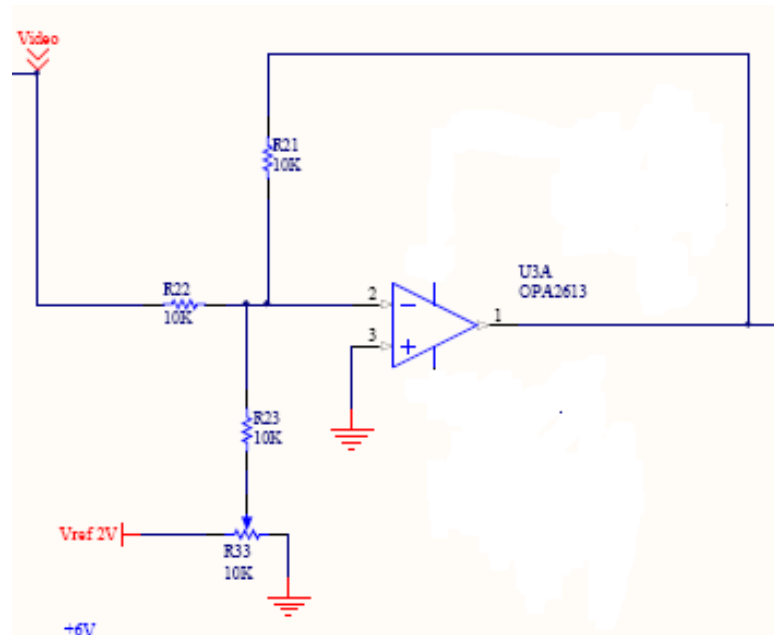


Figura 14: Representação esquemática do amplificador somador inversor.

O primeiro elemento deste circuito é um amplificador somador inversor com um potenciômetro associado. Este módulo inverte a polaridade (de negativa para positiva), amplifica e remove o *offset* DC do sinal proveniente do sensor.

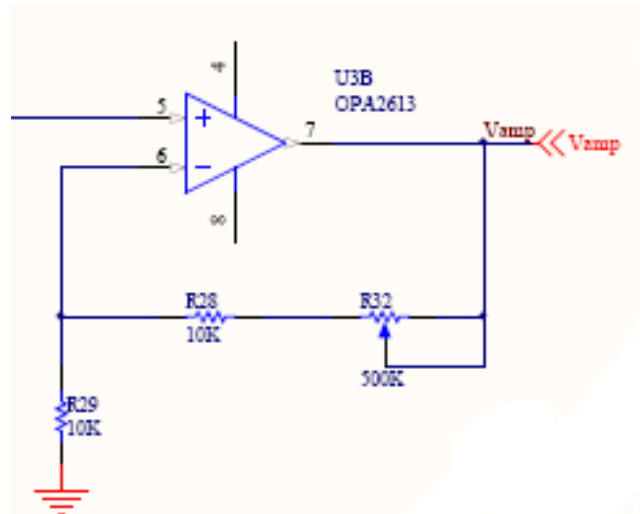


Figura 15: Representação esquemática do seguidor de ganho.

Depois um seguidor de ganho amplifica o sinal, de acordo com a resistência do potenciômetro associado.

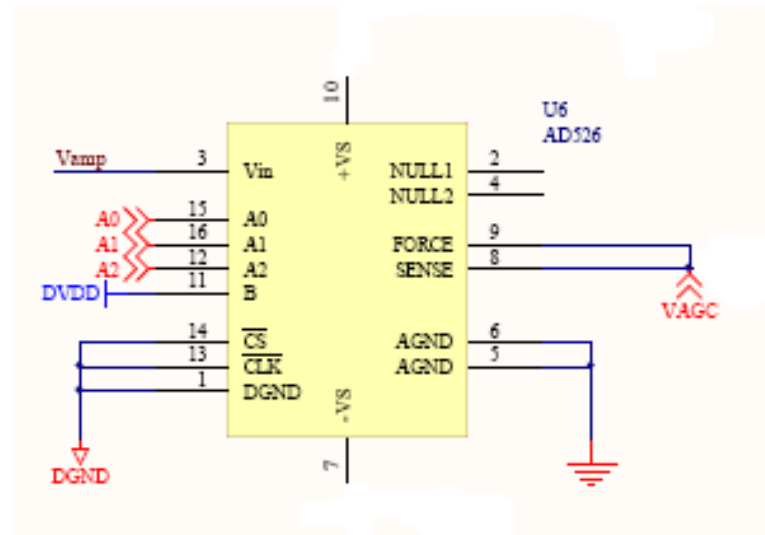


Figura 16: Representação esquemática do PGA.

Seguidamente encontra-se um amplificador de ganho programável (PGA), cujo ganho é controlado pelo microcontrolador dsPIC e pode variar entre cinco níveis binários: 1, 2, 4, 8 e 16. De momento o valor *default* do ganho é 1. De seguida vêm dois seguidores de tensão que geram a entrada positiva do ADC. A entrada negativa é de 0 V (27).

4.3.2. Conversão A/D

As principais características do ADC externo do fluorómetro ocular são as seguintes (32):

Resolução: 16 bits,

Arquitectura delta-sigma;

Entrada diferencial: ± 3 V

Amostragem: 1,25 MSPS

Tensões de alimentação: +5 V, +5 V (analógica e digital, respectivamente)

Interface série 3-wire

Este ADC é adequado aos requisitos do sensor tanto no que diz respeito à resolução, como à entrada diferencial. O ADC tem uma gama dinâmica de 65538 valores, que é suficiente para uma conversão eficiente do sinal dado que a gama dinâmica do CCD é de 24000 valores. Como a saída do sensor esta sempre entre o 0 e os 3 V, a entrada diferencial do ADC é mais que suficiente.

4.3.3. Microcontrolador dsPIC

O uso de um microcontrolador dsPIC (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, EUA) melhorou o sistema de aquisição de dados em termos de programabilidade e portabilidade, uma vez que este consiste num pequeno computador num único chip. O dsPIC combina as características dos microcontroladores de 16 bits e dos processadores de sinais digitais (DSP).

A escolha do dsPIC deveu-se ao facto de ele apresentar uma série de características adequadas ao sistema, entre elas, possuir entradas e saídas digitais e analógicas, portos de comunicação com o exterior, interrupções, temporizadores, arquitectura Harvard modificada de 16 bits optimizada para funcionar com um compilador C e tamanho de memória adequado (12).

Na Tabela 8 encontram-se as características gerais do microcontrolador dsPIC.

Tabela 8: principais características do dsPIC30F6012A (33).

Velocidade CPU	30 MIPS
Memórias	
FLASH	144
RAM	8192
EEPROM	4096
Periféricos	
Portos	52
Módulo SPI	2
Módulo UART	2
Temporizadores	5 – 16bit
	2 – 32bit
Número de pinos	64

4.3.4. Ligação entre o SAD e o PC

A comunicação entre o sistema de aquisição de dados e o PC pode ser feita por USB ou através da interface RS-232. Actualmente é utilizada a interface RS-232.

O módulo UART do microcontrolador utiliza duas vias de transferência de dados, uma de recepção (RX) e outra de transmissão (TX) em modo *full-duplex*, promovendo assim a comunicação de série assíncrona entre o computador e o SAD. Este modo de comunicação não necessita do envio de um sinal clock ao receptor (12).

O processo de transmissão de dados segue a seguinte sequência (12):

1. A via TX é colocada a um nível lógico mais baixo durante a duração de um bit – start bit
2. São enviados os bits de dados

3. Se existe, é enviado o bit de paridade
4. É enviado o bit de paragem
5. A via TX volta ao estado inicial

Seguidamente apresentam-se os parâmetros de configuração da interface RS-232 (27):

Velocidade de transmissão: 115200 bits/s

Bits de dados: 8

Bits de paridade: nenhum

Bits de paragem: 1

Controlo de fluxo: nenhum

A interface possui um conector de 9 pinos designado DB-9 e uma driver RS-232 (ICL3232) que tem como função gerar os níveis de tensão e polaridades requeridas pela interface RS-232 (27).

As funções do dsPIC responsáveis pela recepção e transmissão de dados são a *handle_string()* e a *send_string()* respectivamente (27).

4.3.5. Alimentação

O sistema de aquisição de dados do fluorómetro ocular necessita de uma fonte de alimentação de corrente contínua. Como a rede pública fornece corrente alternada, é utilizado um transformador FL 52/24 com tensão de saída de 2x24V de modo a transformar a corrente alternada em corrente contínua. A fonte de alimentação conta ainda com três reguladores de tensão de 24, ± 15 e ± 6 V e um regulador DC/DC step-down que fornece a alimentação analógica e digital de ± 5 V (12).

5. Descrição do software

5.1. Software do dsPIC

5.1.1. MPLAB IDE

O MPLAB IDE (*integrated development environment*) é uma ferramenta utilizada para desenvolver aplicações para microcontroladores da *Microchip*. Este software permite escrever o código fonte, compilar e simular tanto em ambiente de desenvolvimento integrado como directamente no componente. A versão do MPLAB IDE utilizada nesta aplicação é a v8.30 e o compilador utilizado é o MPLAB c30 C *Compiler*. A programação é feita na linguagem C (12).

5.1.2. Estrutura do software do microcontrolador

O software do dsPIC encontra-se distribuído por ficheiros de duas categorias, os *source files* e os *header files*. Os *header files* contêm maioritariamente a definição e inicialização de variáveis e interrupções. Os *source files* realizam a recepção e execução dos comandos e tarefas requeridas. Na Tabela 9 encontra-se a descrição do conteúdo de cada ficheiro.

Tabela 9: Organização e descrição do conteúdo do software do microcontrolador (27).

	Ficheiro	Descrição do conteúdo
Header Files	Delay.h	- definição das variáveis das rotinas de temporização - definição da frequência e velocidade do CLK externo
	Config.h	- interrupções accionadas pela variável <i>counter</i> - inicialização do pino 1, pino 3, <i>timer1_Pixduration</i> e do módulo de comunicação síncrona SPI2
	Hardware.h	- definição e inicialização dos pinos do dsPIC - configuração do ADC interno - configuração dos botões <i>switch</i> S1 e S2 - configuração dos LEDs - configuração dos pinos ligados ao ADC externo - configuração dos pinos ligados ao PGA e definição do ganho - controlo da câmara CCD e dos sensores NMOS
	OscillatorSystemCodes.h	- configuração dos osciladores - definição da frequência do relógio FRC
	System.h	- definição da temporização do CLK do sistema - configuração do modo XT x PLL8 do oscilador, da taxa de transferência e do tempo de ciclo de instrução

		<ul style="list-style-type: none"> - definições da porta de série - definição dos comandos para operar os sensores - inicialização das variáveis externas
Source Files	Clock_switch.c	Rotinas de alteração dinâmica do clock de acordo com as definições feitas em OscillatorSystemCodes.h
	Delay.c	Geração dos <i>delays</i> aplicados ao longo do ficheiro main.c
	Traps.c	Contem os vectores de interrupção de erro interno do processador
	Config.c	<ul style="list-style-type: none"> - Inicialização do timer1, do timer1_Pixduration e dos pinos 1 e 3 - inicialização no módulo de configuração síncrona com o ADC externo - Configuração do ADC
	Hardware.c	<ul style="list-style-type: none"> - definição e controlo dos vários níveis de ganho do PGA - inicialização e configuração dos portos B, C, D, F e G através da função <i>input/output</i> - inicialização dos pinos de controlo da câmara CCD e dos sensores NMOS
	Interrupt.c	<ul style="list-style-type: none"> - rotina de interrupção do timer1, do botão de pressão SW2 e do sinal EOS - rotina de recepção e transmissão dos dados da porta de série
	USART.c	<ul style="list-style-type: none"> - Inicialização das variáveis temporárias naq, pix e no_pix e das variáveis numero_leituras, pix_duration e no_pixeis - inicialização das <i>strings</i> correspondentes aos parâmetros e comandos controlados através da porta de série - inicialização do módulo Uart2 - configuração da porta de série - executa a tarefa associada a cada <i>string</i> recebida ou inicializada
	Main.c	<ul style="list-style-type: none"> - execução das tarefas em resposta aos comandos introduzidos - selecção do programa associado a cada sensor de imagem (CCD ou NMOS)

Comandos

Na Tabela 10 encontra-se uma descrição da tarefa executada por cada comando implementado no microcontrolador. Dos comandos apresentados os que podem ser controlados pelo Matlab são os comandos NAQ, PIX e NOP.

Tabela 10: Descrição da função dos comandos implementados no microcontrolador (27).

Comando	Tarefa
WAKE	Coloca o processador a full-power (elevado consumo de energia)
SLEEP	Coloca o processador em baixo consumo de energia
READ	Permite saber se ocorreu ou não overflow do ADC
CCD	Lê os pixels do sensor de imagem NMOS
CAMERA	Lê os pixels da câmara CCD
MEDIA	Devolve 2000 valores da saída do sensor de imagem, em que cada um resulta da média de 16
ACQ	Devolve 2048 valores da saída do ADC, pressionando o interruptor S1 antes e depois da aquisição desses valores
DEC	Diminui o ganho do PGA
INC	Aumenta o ganho do PGA
ADC	Devolve as tensões em vários pontos do SAD
NAQ	Selecciona o número de médias a fazer por pixel durante a leitura do sensor. O valor default para a câmara CCD é 20.
PIX	Permite a escolha da largura (duração) de cada pixel durante a aquisição
NOP	Permite seleccionar o número de pixels a ler pelo sensor e activa a parte de código correspondente no software do dsPIC

Os parâmetros *nscan* e *texp* podem também ser controlados através do Matlab. O parâmetro *nscan* indica o número de varrimentos que o fluorómetro faz por aquisição. O parâmetro *texp* refere-se a duração de cada varrimento. Os parâmetros *NAQ*, *PIX* e *texp* estão interligados, não podendo assumir quaisquer valores.

Os parâmetros *NAQ*, *PIX*, *NOP* e *texp* são usados pelo dsPIC para produzir com flexibilidade os sinais de temporização a fornecer à câmara CCD em termos de duração da exposição e do *Master CLK* e também para controlar o número de conversões por pixel.

5.2. Interface Gráfica

Foi utilizada a ferramenta GUIDE do Matlab R2007a para o desenvolvimento de uma interface gráfica de comunicação entre o sistema de aquisição de dados e o utilizador. Sempre que se achou necessário a interface foi sendo desenvolvida através do melhoramento da versão existente e da adição de novas funções (12)(27). A versão actual da interface e os melhoramentos implementados vão ser descritos a seguir.

5.2.1. Janela de aquisição

A janela de aquisição permite a visualização da aquisição em tempo real e também da média de todas as aquisições realizadas até ao momento. Esta tem três menus que estão descritos na

Tabela 11.

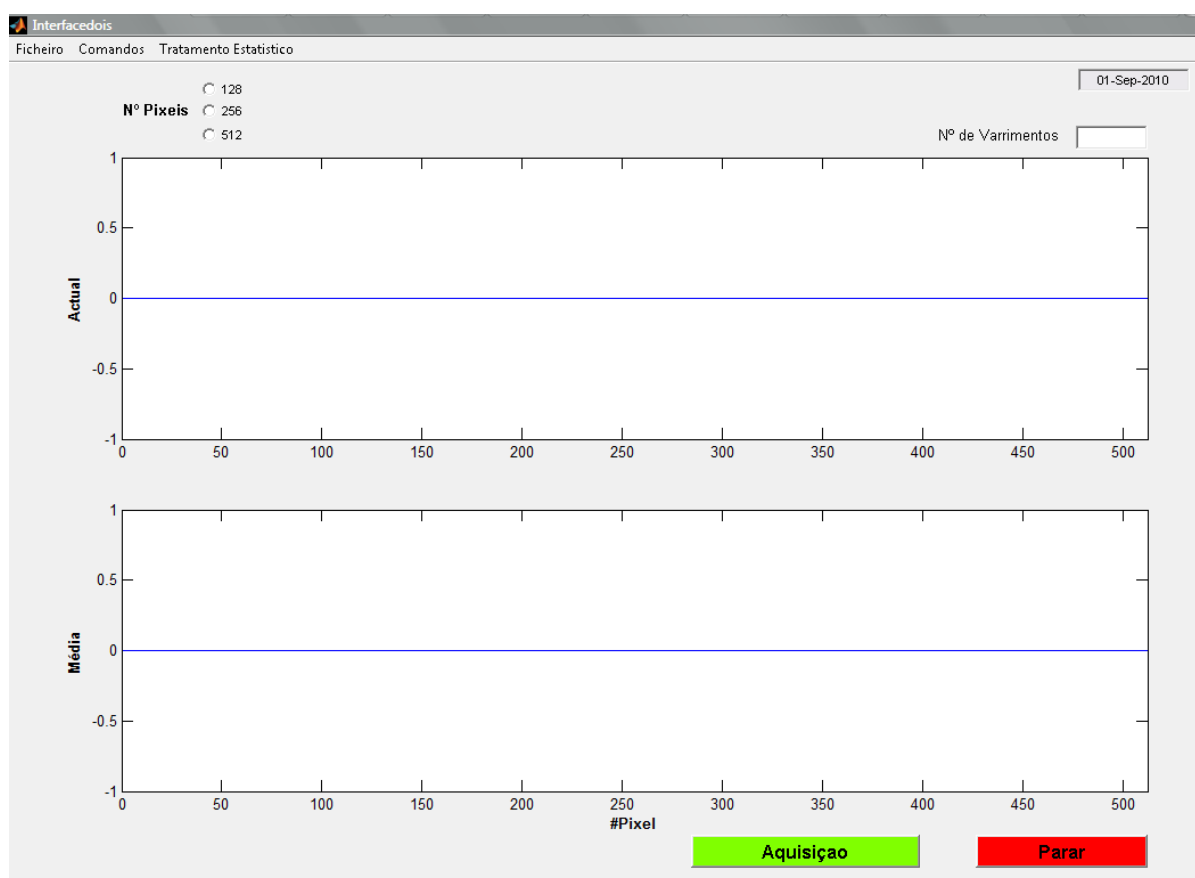


Figura 17: Janela de aquisição da interface gráfica.

Tabela 11: Funções da janela de aquisição.

Menu	Opções	Descrição
Ficheiro	Iniciação	Inicia a porta de série
	Novo	Reinicia a janela de aquisição
	Abrir	Abre uma janela onde é possível abrir aquisições já guardadas e consultar os parâmetros da aquisição (Figura 18)
	Guardar	Guarda as aquisições numa pasta predefinida com o formato .mat e atribui um nome ao ficheiro de forma automática (concentração+data+hora).
	Sair	Fecha a janela de aquisição
Comandos	Wake	Coloca o processador a full-power
	Sleep	Coloca o processador em baixo consumo de energia
	ADC	Abre uma janela com valores de tensão em vários pontos do SAD
	Amplificador de ganho ajustável	Diminui ou incrementa o ganho de amplificador de ganho programável e é devolvida uma caixa de texto com o valor do ganho
Tratamento estatístico	Abre a janela de tratamento estatístico	

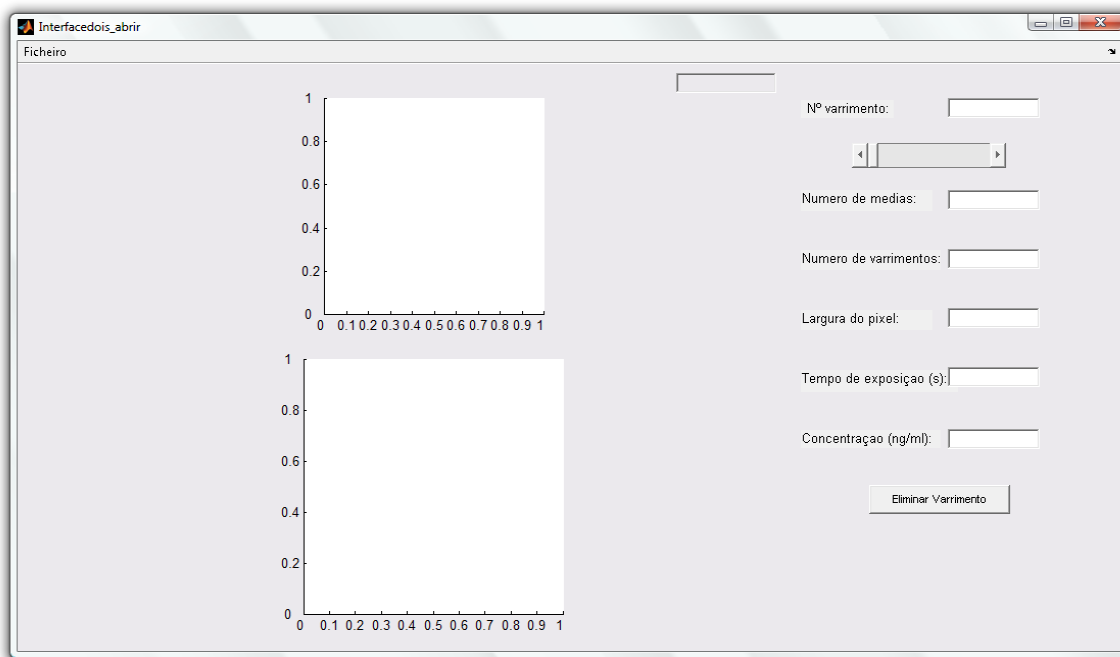


Figura 18: Janela de revisão de dados da interface gráfica.

É na janela de aquisição que se selecciona o sensor que se vai utilizar: 128, 256 ou 512 pixeis. Esta informação é imediatamente transmitida ao dsPIC que activa a parte de código correspondente ao sensor escolhido. Além disso, quando se escolhe o número de pixeis, o sistema de eixos onde se projectam os dados, muda automaticamente o tamanho do eixo horizontal para o numero de pixeis escolhidos.

A escolha dos parâmetros de aquisição e consequente inicio da aquisição são feitas no botão Aquisição e pode-se interromper a aquisição no botão Parar.

5.2.2. Parametros e inicio da aquisição

Nesta janela de configuração podem ser escolhidos os parâmetros e iniciar a aquisição.

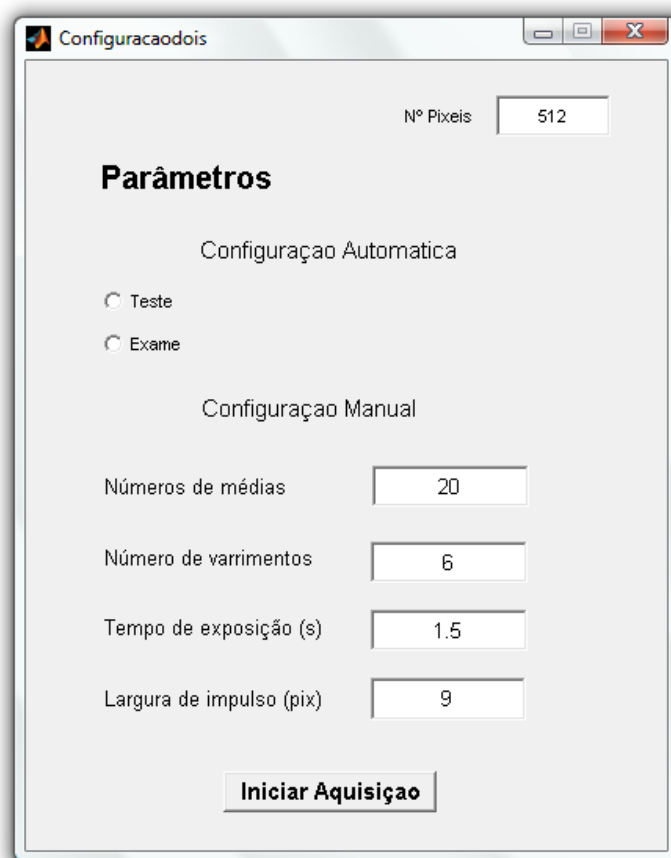


Figura 19: Janela de configuração dos parâmetros de aquisição.

No âmbito da realização de testes com pacientes foi adicionado o modo de Configuração Automática. Se for seleccionado o modo Teste será iniciada uma aquisição longa que permite ao operador posicionar o paciente e focar o olho enquanto observa a imagem obtida em tempo real. Seguidamente inicia-se uma aquisição no modo exame, de curta duração, para guardar. Desta maneira o tempo de espera entre o processo de focagem e a aquisição propriamente dita é menor, diminuindo assim o desconforto do paciente que tem de permanecer imóvel.

Ao premir o botão Iniciar Aquisição os parâmetros de configuração são transmitidos para o dsPIC e armazenados em ficheiros .txt para consulta posterior. Além disso verifica se os valores dos parâmetros inseridos são aceitáveis. Se não, devolve uma mensagem de erro. Finalmente inicia-se a aquisição.

Quando se inicia uma aquisição, surge uma barra de progressão que nos permite saber em que ponto da aquisição nos encontramos (

Figura 20).



Figura 20: Barra de progressão.

5.2.3. Tratamento estatístico

A janela de tratamento estatístico contém uma serie de funções que facilitam a análise dos dados adquiridos e permite abrir aquisições guardadas e calcular a média e o desvio padrão da zona de interesse da imagem.

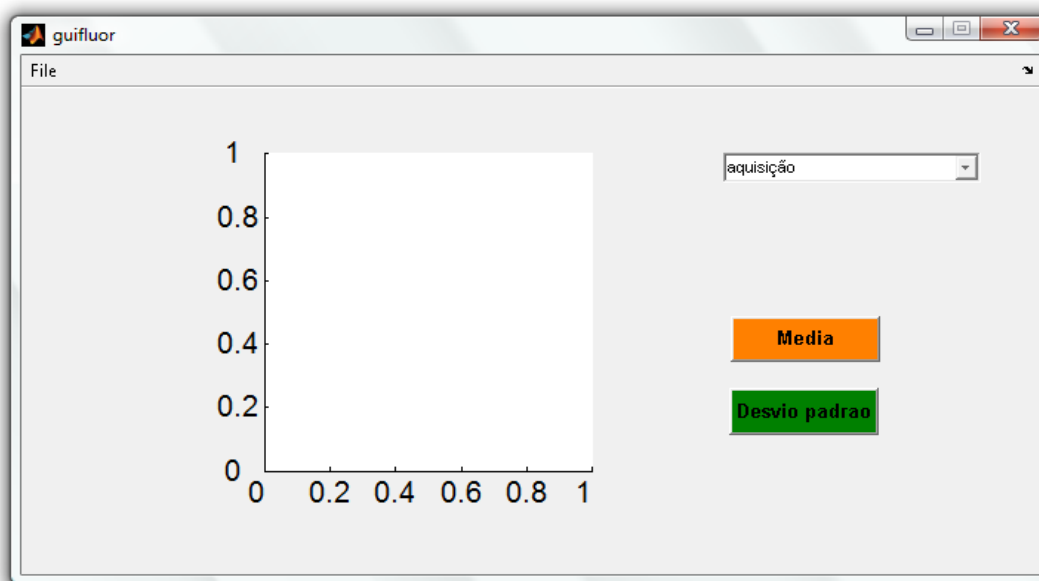


Figura 21: Janela de tratamento estatístico.

O resultado produzido por cada uma das funções é o seguinte:

- **Aquisição:** permite visualizar uma aquisição e indica o valor ADC máximo da mesma.
- **Histograma:** calcula a média de uma zona de interesse estatístico de cada varrimento. De seguida distribui este valor por intervalos de amplitude 10, resultando assim um histograma que no eixo horizontal

tem os valores ADC médios e no eixo vertical a frequência com que ocorrem.

- **Zona de interesse:** selecciona uma zona da imagem com características estáveis útil para testes de linearidade. A zona de interesse está definida como sendo o intervalo entre o pixel de valor máximo e os dez pixeis seguintes.
- **Filtro:** esta função aplica um filtro de médias móveis a todos os varrimentos efectuados e de seguida faz a média desses varrimentos, devolvendo apenas uma curva.

6. Resultados

Em todos os testes realizados com o fluorómetro ocular foi utilizado um procedimento semelhante que se encontra descrito a seguir, tanto para aquisições com cuvette, como para aquisições com pacientes:

1. Liga-se o sistema de aquisição de dados. A alimentação e a placa electrónica devem ser ligadas em simultâneo.
2. Liga-se o PC e abre-se a interface gráfica em Matlab para a obtenção dos dados.
 - 2.1. Escolhe-se o número de pixels do sensor;
 - 2.2. Inicia-se a porta de serie;
3. O sujeito senta-se numa cadeira estável junto ao fluorómetro e apoia a testa e o queixo nos locais apropriados/ coloca-se a cuvette no suporte para cuvettes;
4. Liga-se a fonte de halogéneo.
5. Escolhe-se a intensidade da fonte e a ampliação de Galileu desejadas.
6. Foca-se o feixe de luz azul no olho do paciente movendo a fonte horizontalmente através da consola e verticalmente com os parafusos / foca-se uma zona da cuvette
7. O operador, utilizando o divisor de feixe, encaminha a luz de fluorescência para o sensor.
8. Inicia-se uma aquisição-teste no software. Com o apoio da imagem adquirida a tempo real realizam-se os últimos ajustes na focalização da câmara anterior/cuvette
9. Quando se obtiver a imagem desejada, pára-se a aquisição teste e inicia-se uma aquisição-exame. Nesta transição o paciente deve-se manter imóvel.
10. Guardam-se os dados.

6.1. Testes *in vitro*

As aquisições *in vitro* foram realizadas utilizando uma cuvette (1*1cm²) preenchida com soluções de fluoresceína de concentração conhecida, da mesma ordem de grandeza da autofluorescência da córnea (10 ng/ml equivalente de fluoresceína).

O ângulo da lâmpada de fenda (α na Figura 5) utilizado para todas as aquisições foi de 90°, dado que este se mostrou adequado para fazer aquisições com uma cuvette quadrada dado que desta maneira a luz não interfere com as suas arestas (27). Além disso, com este ângulo tem-se o melhor aproveitamento da resolução do sistema e é o adequado para aquisições da câmara anterior.

Além dos testes descritos mais pormenorizadamente a seguir foram realizados outros testes de optimização do sistema. Foram realizadas

aquisições para várias posições da lente de focagem e para vários filtros de emissão e de excitação. A configuração final do sistema foi escolhida com base na observação das imagens obtidas.

6.1.1. Linearidade

O teste de linearidade tem como objectivo verificar a existência de uma relação linear entre a quantidade de luz incidente e o valor de saída do ADC. É importante realizar este teste periodicamente para verificar se ocorrem alterações da linearidade com o tempo e também sempre que se realizam alterações no sistema. Além disso, a recta de calibração (Figura 23) serve para fazer a conversão de unidades ADC para unidades de concentração (ng/ml).

Para calcular o erro de não-linearidade procedeu-se da seguinte maneira. Fizeram-se três aquisições para cada concentração com os seguintes parâmetros.

Tempo de integração: 0,5s

Número de varrimentos: 6

Numero de médias: 20

Largura do pixel: 3

De seguida escolheu-se uma zona de interesse de 50 pixels com características estáveis, calculou-se a média de cada pixel e depois a média dos 50 pixels. Por fim calculou-se a média das três aquisições. Esses valores encontram-se na

Tabela 12.e representados na Figura 23. Seguidamente fez-se um ajuste linear aos pontos e calculou-se o desvio de cada ponto ao ajuste.

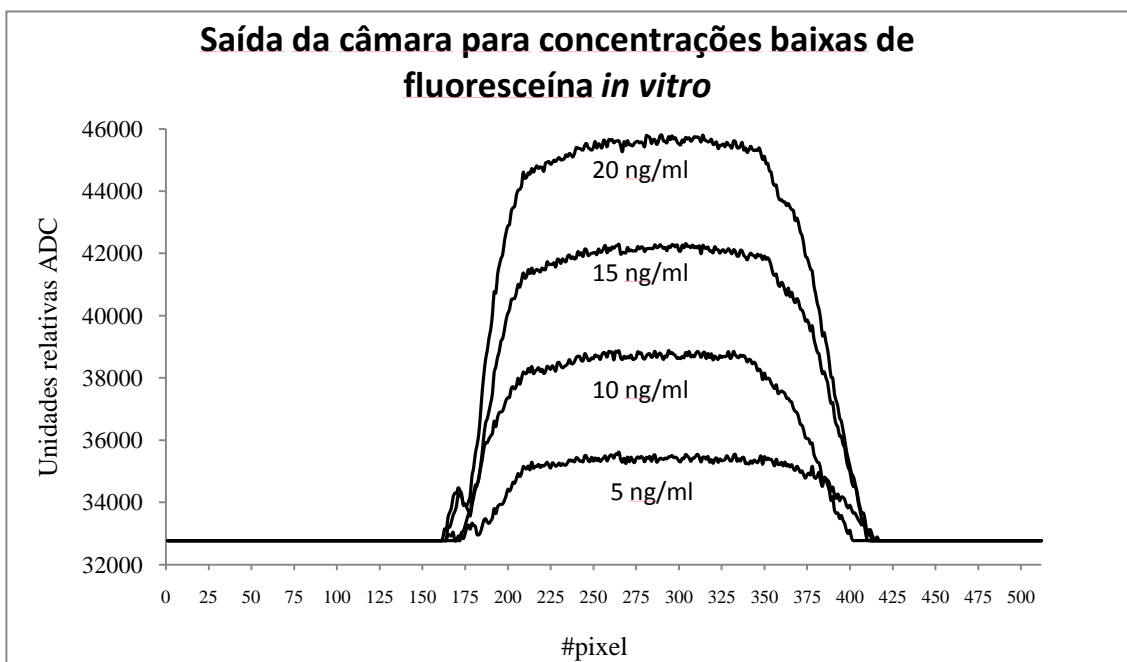


Figura 22: Resposta do sensor para medições em cuvettes com soluções de fluoresceína de baixa concentração.

Os dois primeiros varrimentos foram sempre excluídos devido a sofrerem o fenómeno de LAG. Na Erro! A origem da referência não foi encontrada. ncontra-se a imagem obtida para concentrações baixas de fluoresceína. Cada imagem representa a média dos quatro últimos varrimentos de cada aquisição.

Tabela 12: Valores para medição da linearidade.

[fluoresceína] (ng/ml)	Média de 50 pixels (Unidades ADC)	Desvio do melhor ajuste (unidades ADC)
5	35443	64
10	38735	-111
15	42340	27
20	45798	18

O erro de não-linearidade é definido como sendo o maior desvio entre os resultados experimental e o melhor ajuste. Para a câmara CCD S5469 obteve-se um erro de linearidade de 2%.

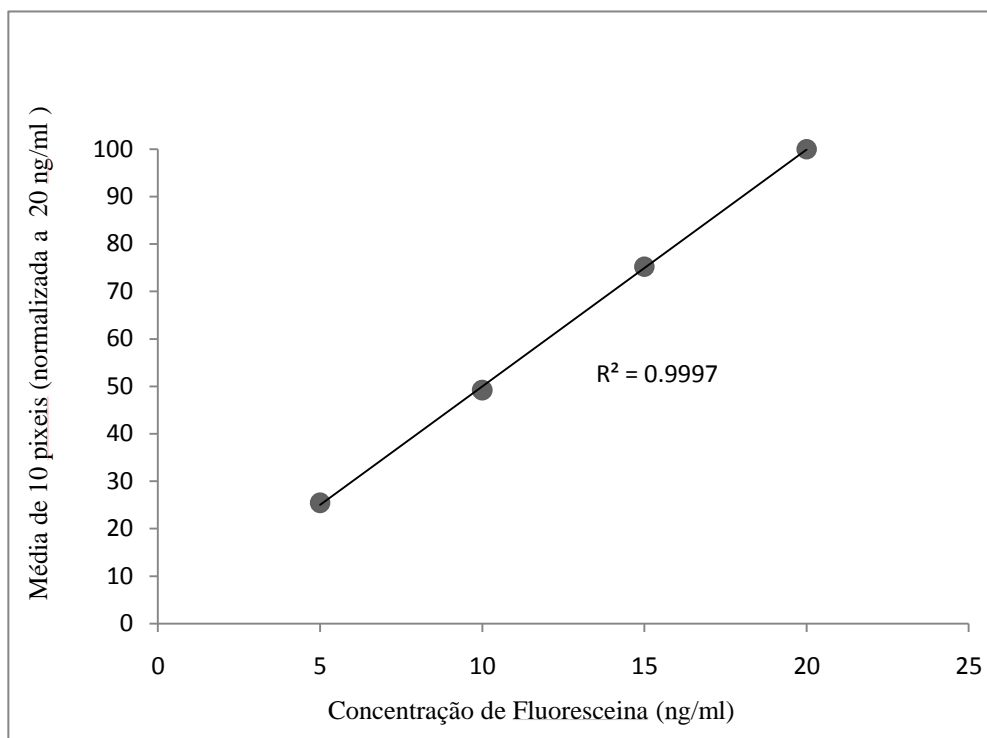


Figura 23: Recta de linearidade do sensor para baixas concentrações de fluoresceína.

6.1.2. Limite mínimo de detecção (LMD)

O limite mínimo de detecção é definido como o incremento mínimo de luz que o sensor consegue discriminar. Nas câmaras CCD o LMD é determinado essencialmente pela corrente no escuro. No contexto deste trabalho o LMD definiu-se com sendo o dobro do desvio padrão do valor médio de uma aquisição no escuro (nível de luz detectado para uma concentração de 0ng/ml).

Para tal realizou-se uma aquisição no escuro de 3000 varrimentos (Figura 24) e calculou-se a média e o desvio padrão ($\bar{m} \pm \sigma$):

$$\bar{m} \pm \sigma = 33424 \pm 40 \text{ unidades ADC}$$

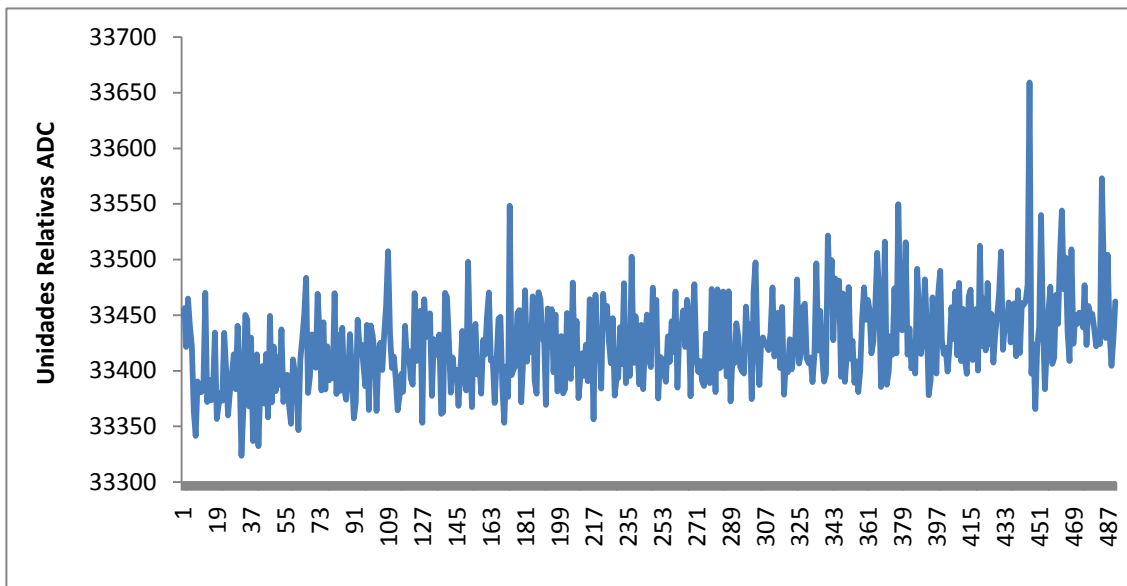


Figura 24: Curva característica para aquisição com 0ng/ml de concentração de fluoresceína.

De seguida, utilizando a recta de calibração converteu-se o dobro do desvio padrão para unidades de concentração. Obteve-se um LMD de 0,1ng/ml. Então a câmara CCD consegue detectar variações de concentração de, no mínimo, 0,1ng/ml.

Para sensor NMOS de 128 pixeis utilizado anteriormente no fluorómetro ocular foi calculado um LMD de 1,4ng/ml (27). O uso da câmara CCD é assim vantajoso na medição de níveis baixos de fluorescência, como é o caso da Autofluorescência da córnea, onde pequenas variações de concentração têm interesse clínico. O Fluorotron Master apresenta um LMD de 0,5ng/ml.

6.1.3. Resolução Axial

O valor da resolução traduz a capacidade do sensor distinguir duas estruturas em termos espaciais. Como a área activa da câmara CCD consiste em pixeis discretos, esta apresenta uma resolução espacial limitada. Por exemplo, se um objecto a preto e branco é observado por um CCD, o contraste entre as zonas pretas e brancas diminui à medida que o padrão do objecto se torna mais “fino”. A resolução depende da profundidade a que são absorvidos os fotões no material semiconductor. Quanto menor a energia dos fotões incidentes, mais a resolução se deteriora (29).

A resolução depende principalmente do sistema de amplificação de Galileu e do sistema óptico do fluorómetro, em especial da lente de focagem. Foram feitas aquisições com diferentes amplificações e através da experiência e da observação das imagens obtidas e também da análise da 1ª derivada da imagem na zona de fronteira. Verificou-se que se obtinham melhores

resultados com as ampliações de 12x e 30x. A resolução depende também da distância de pixel a pixel. O uso da câmara CCD trouxe uma vantagem neste campo já que tem uma distância de pixel a pixel de $25\mu\text{m}$, enquanto os sensores NMOS têm uma distância de pixel a pixel de $50\mu\text{m}$.

Numa segunda fase realizaram-se aquisições (amplificação de 30x, tempo de integração de 1s e largura de pixel de 6) com o alvo USAF 1951 grupo 1 linha 6 ($3,56\text{LP/mm}$) (Figura 25). Consegue-se alcançar uma resolução de $100\mu\text{m}$.

Os testes realizados permitiram-nos obter um valor para a resolução lateral. Estes coincidem com a resolução axial (ao longo do eixo óptico) uma vez que se usa um ângulo da lâmpada de fenda de 90° .

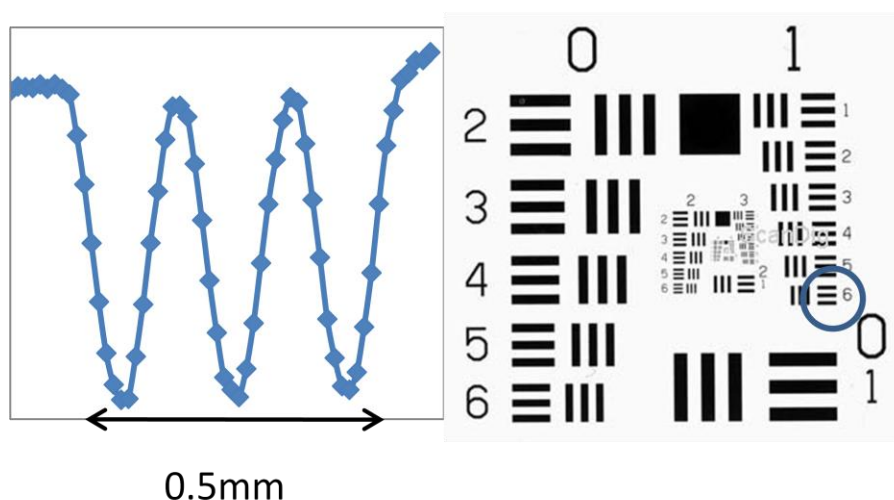


Figura 25: Medidas de resolução lateral com o alvo USAF 1951.

6.2. Testes *in vivo*

Os últimos testes a serem realizados com o fluorómetro ocular foram testes em pacientes. Com a experiência adquirida escolheram-se as melhores características de aquisição.

Número de médias: 20

Largura do pixel: 9

Tempo de integração: 1,5s

Amplificação óptica: 30x

Intensidade de luz máxima

O nosso interesse era obter o pico da autofluorescência da córnea. Na Figura 26 entra-se representada a imagem obtida numa aquisição com as

características referidas anteriormente. Estão representados dois varrimentos com reprodutibilidade do pico de 7%.

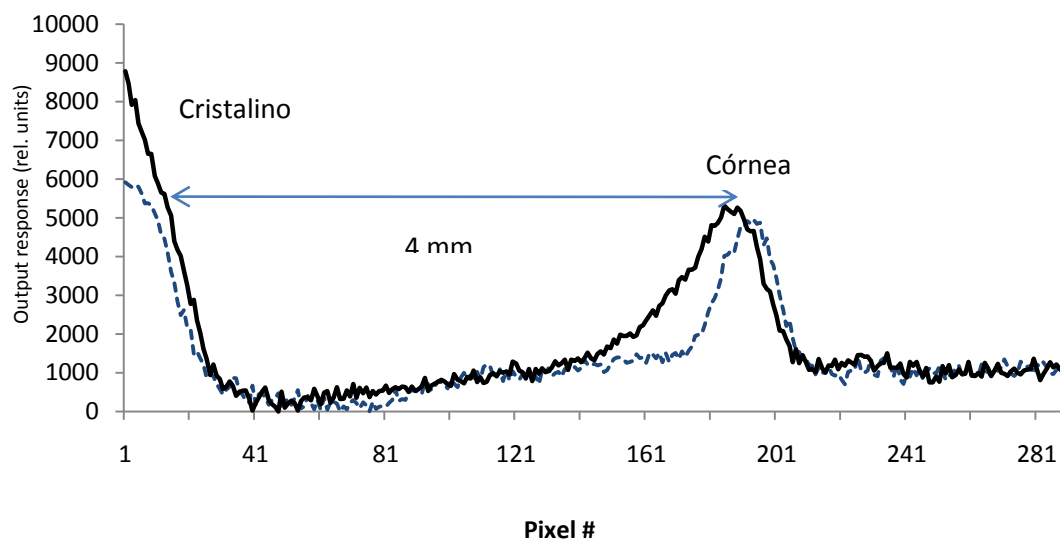


Figura 26: Resultados preliminares da medição da autofluorescência da córnea (dois varrimentos)

O declive do lado direito da imagem corresponde à autofluorescência do cristalino. Considerando o número de pixels entre este declive e o pico e também a amplificação óptica utilizada, calculou-se a distância correspondente no olho do paciente. Obteve-se um valor de 4mm.

A dimensão média da câmara anterior de acordo com as dimensões do olho padrão de Gullstrand emetrópico e não-acomodado é de 3,6 mm, numa gama de 2,0 a 4,5 mm (34). Pode-se assim concluir que o pico se refere à autofluorescência da córnea, como se pretendia.

7. Conclusão

Não existem dúvidas quanto ao papel da fluorometria ocular no diagnóstico e monitorização da retinopatia diabética.

Ao longo dos capítulos anteriores foram descritos os fundamentos por detrás do uso da técnica de fluorometria ocular como método de diagnóstico, bem como do sistema de fluorometria ocular utilizado para a obtenção dos resultados.

Com a realização dos testes *in vitro* conseguiu-se verificar que o nosso sistema de fluorometria ocular apresenta características comparáveis ao fluorómetro ocular de referência, o FM, nomeadamente no que diz respeito ao limite mínimo de detecção. Por isso procedeu-se à realização de aquisições *in vivo*, o que nos permitiu aceder à autofluorescência da córnea.

Como trabalho futuro seria interessante continuar os estudos com pacientes de maneira a otimizar as aquisições e para estudar a reprodutibilidade entre aquisições. Neste âmbito seria vantajosa a utilização de filtros com bandas de transmitância mais estreitas de maneira a se conseguir discriminar os fluoróforos e melhorar a resolução.

Seria útil continuar a melhorar a interface gráfica no sentido de a tornar mais user-friendly e de a adaptar às aquisições com pacientes.

Seria também interessante fazer um estudo sobre o efeito da alteração do ganho do PGA (controlável através da interface gráfica) nas imagens adquiridas.

Bibliografia

1. **S. Andersson-Engels, C. af Klinteberg, K. Svanberg e S. Svanberg.** *In vivo fluorescence imaging for tissue diagnosis.* 1996.
2. Nossa Ótica. [Online] http://www.nossaotica.com/beleza_saude.htm.
3. Laboratório Ótico Rigor. [Online] <http://www.laboratoriorigor.com.br/anatomia.html>.
4. **Seeley, Stephens, Tate.** *Anatomia e Fisiologia.* s.l. : Lusociência.
5. **R.F. Brubaker, D.M. Maurice e J.W. McLaren.** *Fluorometry of the Anterior Segment.*
7. **Franco Docchio, Luca Biancardi.** *Euroeye Atlas of Ocular Fluorophores.* Coimbra : s.n., 1995.
8. **Cunha-Vaz, J.** Optical Sensors for Clinical Ocular Fluorometry. 1997, Vol. Progress in Retinal and Eye Research V.16.
9. **Morgado, A. M.** Fluorometria ocular não-invasiva: técnicas e instrumentação. Coimbra. 2002.
10. **Best, Jaap A. van e Kuppens, Esmeralda V.M.J.** Summary of studies on the blue-green autofluorescence and light transmission of the ocular lens. *Journal of Biomedical Optics.* 1996.
11. **Myron Yanoff, Jay S. Duker.** Ophthalmology . 2008.
12. **Alberto, Mónica.** Fluorometria Ocular Clínica. 2008.
13. Fluorotron (TM) Master. [Online] [//www.facebook.com/reqs.php#!/?ref=logo](http://www.facebook.com/reqs.php#!/?ref=logo).
14. **José G. F. Cunha-Vaz, José P. P. Domingues e Carlos M. B. A. Correia.** *Ocular Fluorometer.* 6013034 11 de Janeiro de 2000.
15. Visão, Dr. Ergo - Clínica Especializada na. Retinopatia Diabética. [Online] <http://www.ergovisao.pt/files/retinopatia.pdf>.
16. **Congdon, Nathan G., Friedman, David S. e Lietman, Thomas,** *Important Causes of Visual Impairment in the World Today..* 2003.
17. **Ramandeep Singh, MS, et al.,** *Diabetic retinopathy: An update.* 2008, Vol. Indian J Ophthalmol.
18. **R. Schalnus, C. Ohrloff, E. Jungmann, K. MaaB, S. Rinke, A. Wagner** ,*Permeability of the blood-retinal barrier and the blood- aqueous barrier in type I diabetes without diabetic retinopathy: simultaneous evaluation with fluorophotometry..* 1993, Vol. German J Ophthalmol.
19. **José Cunha-Vaz, Eugénio Leite, João Castro Sousa, José Rui Faria de Abreu** ,*Blood Retinal-Barrier permeability and its relation to progression of retinopathy in patients with type 2 diabetes. A four-year follow-up study..* 1993.

20. **A. Yoshida, S. Ishiko, M. Kojima, H. Ogasawara** *Permeability of the blood-ocular barrier in adolescent and adult diabetic patients..* 1993.
21. **S. Ishiko, Akitoshi Yoshida, F. Mori, T. Abiko, N. Kitaya, S. Konno, Y. Kato** *Corneal and Lens Autofluorescence in Young Insulin-Dependent Diabetic Patients..* 1998.
22. **Kuppens, J. A. van Best e E. V. M. J.,** *Summary of studies on the blue-green autofluorescence and light transmission on the ocular lens.* 1996.
23. **Alonso I., Beneyto P., Perez T.M., Fonseca Sansomingo F.,** *Estudio de la Autofluorescencia Corneal y Cristaliniana Mediante Fluorofotometria en sujetos Diabéticos.* 1998.
24. Laser photocoagulation for diabetic retinopathy. [Online]
<http://www.peacehealth.org/kbase/topic/detail/other/tf4075/detail.htm>.
25. **K.K., Hamamatsu Photonics.** *FFT-CCD Image Sensor Multichannel Detector Head.* 1995.
26. **Hamamatsu.** *FFT_CCD Image Sensors for Scientific Applications S5469 series.* 1994.
27. **Vitór, Manuel.** *Fluorómetro Ocular - Upgrade.* 2009.
28. **Hamamatsu.** *FFT-CCD Area Image Sensor Application Note.*
29. **Hamamamatsu.** *Characteristics and use of FFT-CCD area image sensor.*
30. **Hamamatsu.** *NMOS linear image sensor - S3921/S3924 series.*
31. **Hamamatsu,** *Characteristic and use of NMOS linear image sensors.*
32. **Instruments, Burr-Brown Productions form Texas.** *6-Bit, 1.25MSPS Analog-to-Digital Converter.* 2005.
33. **Microchip.** *PIC18F2420/2520/4420/4520.*
34. **Domingues, José Paulo Pires.** *Contribuição para o esenvolvimento de nova instrumentação e novos métodos para Fluorometria Ocular de aplicação clínica.* Coimbra : s.n., 1997.

